

Über Wirkungen von Saponin
(purum album Merck)
auf verschiedene Bakterien, besonders auf
Escherichia coli und *Serratia marcescens*

von
GUDRUN WILDNER

München 1964

1965



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555228_0071

Über Wirkungen von Saponin (purum album Merck)

auf verschiedene Bakterien, besonders auf

Escherichia coli und Serratia marcescens

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Gudrun WILDNER

aus

Kaaden a.d. Eger

November 1964



Berichterstatter: 1. Prof.Dr.F.Bukatsch
2. Prof.Dr.L.Brauner

Tag der mündlichen Prüfung: 26.5.1965

Mikrokopie GmbH . München 22 . Bruderstraße 9

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Material und Methodik	4
C. Versuchsergebnisse	13
I. Einfluß von Saponin (p.a. Merck) auf Wachstum und Atmung von Bakterien, insbesondere von <i>Escherichia coli</i> und <i>Serratia marcescens</i>	13
1. Verwertung von Saponin (Merck) als Kohlenstoffquelle	13
2. Vergleichende Versuche über die Bakterienatmung und das Bakterien- wachstum auf Saponin (Merck) bzw. Glukose	21
3. Mögliche Ursachen der wachstums- fördernden Wirkung von Sapo- nin (Merck) für <i>Escherichia coli</i> und <i>Serratia marcescens</i>	27
a) Eignung des Saponins (Merck) als Nährstoff	27
aa) Atmung von <i>Escherichia coli</i> und <i>Serratia marcescens</i> auf Saponinhydrolysat	28
bb) Nachweis von reduzierenden Zuckern im Saponinhydro- lysat	29
cc) Atmung von Bakterien auf verschiedenen Zuckern	31
dd) Gesamtstickstoffgehalt im Saponin (Merck)	32
ee) Nachweis von Aneurin im Saponin (Merck)	34
ff) Atmung von <i>Escherichia coli</i> und <i>Serratia marcescens</i> in aneurinhaltigen syntheti- schen Nährlösungen	34

	Seite
b) Membranpermeabilität und Saponin (Merck)	35
aa) Einwirkung von Tween 80, einer synthetischen oberflächenaktiven Substanz, auf die Bakterienatmung	36
bb) Verhalten auf Saponin (Merck) kultivierter Bakterien gegenüber Hemmstoffen	36
cc) Abgabe freier Aminosäuren an das Kulturmedium unter dem Einfluß von Saponin (Merck)	38
II. Saponin (Merck) und Bakterienfarbstoffe	42
1. Diffusion verschiedener Bakterienfarbstoffe in saponinhaltige Nährmedien	42
2. Farbe des Serratia pigmentes ("Prodigiosin") und Saponingabe	46
3. Abhängigkeit der diffundierten Farbstoffmenge vom Saponingehalt des Nährbodens	47
4. Vergleichende Untersuchungen über die Abgabe von Bakterienfarbstoff in oberflächenaktiven Lösungen bei unterschiedlichem pH-Wert	53
D. Diskussion	57
E. Zusammenfassung	64
F. Literaturverzeichnis	67

A. E i n l e i t u n g

Saponine sind als sekundäre glykosidische Pflanzenstoffe häufig in Dikotylen, aber auch in Monokotylen und einigen Kryptogamen anzutreffen (BOAS, 1937). Fortlaufend werden neue Saponine entdeckt und ihre Konstitution ermittelt. Trotz struktureller Verschiedenheiten sind allen Saponinen bestimmte physikalische und chemische Eigenschaften gemeinsam, wie oberflächenaktive Wirkung, Schaumvermögen, die Bildung wasser-unlöslicher Verbindungen mit Sterinen usw.. Diese Merkmale werden zur Kennzeichnung und Bestimmung der Saponine herangezogen, ebenso wie das durch Saponine beeinflussbare Verhalten mancher biologischen Systeme, z.B. Auflösung von Erythrozyten, Veränderung der Resorptionsfähigkeit tierischer Membranen, Hemmung der Hefegärung.

Die physiologische Wirkung der Saponine gegenüber verschiedenen Organismen ist in ihren Erscheinungsformen vielfältig; dabei dürfte allerdings von nicht zu unterschätzender Bedeutung sein, daß die in der einschlägigen Literatur beschriebenen Versuche mit Saponinpräparaten sehr unterschiedlicher Herkunft, Zusammensetzung und Reinheit durchgeführt wurden.

Zur Einführung in die folgende Arbeit greifen wir einige die Saponinwirkung auf niedere Organismen betreffende Untersuchungsergebnisse heraus:

Mehreren Forschern diente die Jochalge *S p i r o g y r a* als Versuchsobjekt. 1933 wies Otilia MUNTIIU in Plasmolyseversuchen ein Durchdringen des Saponins durch die Zellulosemembran nach sowie eine Steigerung der Glukosepermeabilität in zunehmenden Saponinkonzentrationen. Gleichzeitig war ein vermehrtes Absterben der behandelten Zellen zu beobachten. Eine Veränderung der Zellwand und der kolloidalen Natur des Protoplasmas nahm TORIYAMA (1952) auf Grund seiner Versuche an: Die Chloroplasten junger Spirogyrazellen wurden in Saponinmedium koaguliert, der Zellsaft diffundierte. KÜSTER (1937) stellte Kerndeformationen am gleichen Objekt als Folge einer

Behandlung mit verdünnten Lösungen fest.

Stark verdünnte Lösungen (1:10 000 bis 1:100 000) von Quillaya- und Polygalasaponinen fördern nach BALANSARD und FELLISSIER (1943) die Chlorophyllbildung bei *Proto-coccalen*, höhere Konzentrationen wirken dagegen toxisch.

Bereits 1913 erkannte SOLACOLU, daß Saponine in mineralischen Nährsalzlösungen das Mycelwachstum von *Penicillium glaucum* und *Aspergillus niger* zu steigern vermögen und demnach als Nährstoffe verwertet werden. Eine Förderung des Mycelwachstums bestätigten BLUMER (1937) und SCHOPFER und BLUMER (1938) für *Ustilago violacea*, KLOSA (1951) für *Penicillium notatum* und KASUKÉ und OTA (1953) für gewisse pathogene Pilze. Die beiden letztgenannten Autoren ermittelten dabei eine Konzentrationsabhängigkeit der Saponinwirkung: Niedrige Dosen wirken fördernd, höhere Dosen hemmend. THREN (1940) beschrieb eine vermehrte Sporenkeimung und gleichzeitige Erhöhung der Absterberate von *Phycomycetes* *Blakesleeanus* in einem bestimmten Konzentrationsbereich.

Eingehendere Untersuchungen befaßten sich mit der durch Saponin verursachten Beeinflussung der Hefe-Gärung (NEUBERG und SANDBERG, 1920; BOAS, 1920, 1921, 1928, 1937; SCHWARTZ und KRETZDORN, 1935; THREN, 1940). Hierbei stand die Frage zur Diskussion, ob die Saponinwirkung durch eine Permeabilitätsveränderung der Grenzschichten hinreichend erklärt werden könne.

Unter den *Spaltpilzen* dienten vor allem Kulturen von *Mycobacterium tuberculosis* als Versuchsobjekt. Dabei zeigten sich in Anwesenheit von Saponin folgende Erscheinungen: Verlust der Säurefestigkeit und Immunisationswirkung gegenüber vollvirulenten Tuberkelbakterien (DOSTAL, 1916; DOSTAL und SAHLER, 1918), Veränderung zu kokkenähnlichen Formen und Abnahme der Resistenz in synthetischen Saponinnährlösungen (WYSS, 1923). Marie MAXIM (1935) kam bei der Auswertung ihrer Versuche an *Mycobacterium tuberculosis* zu der

Folgerung, daß Saponin Bakterienlipide und -lipasen zu binden vermag, da der Fettgehalt der Bakterien auf Saponinmedium gegenüber normalen Kulturen fast um die Hälfte verringert war. GERUNDO (1950) erzielte auf saponinhaltigen synthetischen Nährlösungen ein um das Dreifache erhöhtes Wachstum von *Mycobacterium tuberculosis* und sah als wichtigsten der dafür verantwortlichen Faktoren die Herabsetzung der Oberflächenspannung des Mediums durch Saponin an. Nach GUIRARD, SNELL und WILLIAMS (1946) wird auch das Wachstum von Milchsäurebakterien durch sterioide Saponine begünstigt. Verschiedentlich wurde ein enzymatischer Abbau von Saponinen durch Mikroorganismen beobachtet (TWORT, 1907; SCHIESSER, 1952; KRIDER, CORDON und WALL, 1954 usw.).

Die vorliegende Arbeit will einen Beitrag zu der Frage liefern, wie Saponin (purum album Merck) auf Bakterien, insbesondere *Escherichia coli* und *Serratia marcescens*, einwirkt.

B. M a t e r i a l u n d M e t h o d i k

1.

Mehrere am Botanischen Institut der Universität München zur Verfügung stehende B a k t e r i e n s t ä m m e wurden auf saponinhaltigen Nährböden gezüchtet:

Micrococcus luteus

Micrococcus aurantiacus Herkunft: Hyg. Inst. München 1954

Luftkokken, rosa Herkunft: Hyg. Inst. München 1954

Sarcina flava

Bacterium coli = *Escherichia coli*

Herkunft: Hyg. Inst. München 1954

Aerobacter aerogenes

Bacterium prodigiosum = *Serratia marcescens*

Bacterium vulgare = *Proteus vulgaris*

Chromobacterium violaceum

Herkunft: Hyg. Inst. Göttingen
Nr. 1614 1957

Pseudomonas pyocyanea

Bacillus mesentericus

Bacillus mycoides

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis NTTC 66 335 Penicillin-empfindlich

Bacillus subtilis NTTC 66 335 Penicillin- und Streptomycin-empfindlich.

Kulturen von *Escherichia coli* und *Serratia marcescens* dienten zur Bestimmung des Bakterienwachstums (vergl. Kapitel I der Versuchsergebnisse S. 13), da sie, im Nährmedium gleichmäßig suspendiert, für die Atmungs- und Trübungsmessungen in gleicher Weise geeignet erschienen.

Die farbstoffbildenden Stämme wurden zur Untersuchung des Pigmentumsatzes unter Saponineinwirkung (vergl. Kapitel II der Versuchsergebnisse S. 42) herangezogen.

2.

Die Beschaffenheit des Präparates *S a p o n i n u m p u r u m* album Erg. Bd. 6 des DAB (Artikelnummer 7695, Lieferung Nr. 5385 bzw. 849218) charakterisiert eine Mitteilung (1.12.1956) der Herstellerfirma Merck-Darmstadt folgendermaßen:

"Unser reinstes Saponin, die Listensorte Saponinum purum album Erg. Bd. 6 Art. Nr. 7695, stellen wir aus bestimmten, besonders überprüften und ausgewählten Gypsophilawurzeln her. Die Qualitäten dieses Rohstoffes können je nach Jahrgang, Ernte- und Lagerungsverhältnissen geringe, unvermeidliche Unterschiede aufweisen, die auf das Endprodukt nicht ganz ohne Auswirkung bleiben.

Bei diesem Präparat handelt es sich um nichtkristallisierbare Mischungen von Saponinen, die sich in der Größe des glykosidisch gebundenen Zuckerrestes unterscheiden.

In der Literatur ist Saponin 'Merck' sehr oft als Standardsubstanz erwähnt. Dies ist jedoch abzulehnen, da seine uneinheitliche Natur erkannt ist. (Vergl. dazu KOFLER und DAFERT, 1923, S. 217)

Bei der Prüfung des Präparates beschränken wir uns daher auf die Untersuchung der Löslichkeit, der Schaumzahl, der Oberflächenspannung, des hämolytischen Index, des Saponogens, sowie des Aschegehaltes nebst Feuchtigkeit:

Aussehen: Fast weißes Pulver mit schwach gelblichem Stich,

Löslichkeit in Wasser: 1 + 19 : klar,

Schaumzahl: etwa 400,

Reaktion der wässerigen Lösung: neutral,

Normaltropfenzahl nach Traube: etwa 115.

Unter Verwendung von 2% Rinderblutkörperchenaufschwemmung

und 0,9%iger, mit n/15 Phosphatpuffergemisch auf pH 7,4

eingestellter Natriumchloridlösung finden wir im Durch-

schnitt volle Hämolyse bei der Verdünnung 1 : 10 000 bis

1 : 18 000.

Sapogengehalt: 20 bis 23%,

Feuchtigkeit: etwa 4%,

Sulfatasche: etwa 3%. "

3.

Nährmedien und Wachstumsbedingungen:

Der Nährboden für die Anzucht der Bakterienkulturen bestand aus:

0,3% Cenovis-Hefeextrakt,

1 % Peptonum siccum pro bacteriologia Witte,

1,5% Agar-agar,

der pH-Wert betrug nach der Sterilisation 6,8.

Die Bakterien wurden für die Versuche mehrere Jahre hindurch auf Agar-Nährböden mit 0 - 0,1 - 1 bzw. 5% Saponinzusatz gezüchtet. Sie werden im folgenden wie nachstehend bezeichnet:

E. coli (0), E. coli (0,1), E. coli (1), E. coli (5),

Serr. marc. (0) usw..

Zur Gewinnung von Massenkulturen diene uns eine von Herrn Dr. LEBEK (Bakt. Inst. d. Med. Fakultät d. Univ. München) freundlicherweise angegebene synthetische Nährlösung:

0,5	Gew.Tle.	L-Asparagin rein,
0,5	"	Glycerin doppelt dest. rein,
0,5	"	Natriumsulfat wasserfrei p.a.,
0,15	"	Dikaliumhydrogenphosphat reinst trocken Erg.Bd.6,
0,05	"	Kaliumdihydrogenphosphat krist. reinst,
0,01	"	Magnesiumchlorid krist. p.a. HAB. 2,
100	Vol.Tle.	aqua bidestillata,
		pH: 6,5.

Für die Aminosäurebestimmung in der Kulturlösung (s.S.38) ersetzen wir den Asparaginanteil durch 0,5 Gew.Tle. Ammoniumchlorid.

Die Untersuchung der Farbstoffdiffusion erfolgte auf synthetischem Nähragar (synthetische Nährlösung + 1,5% Agar-agar).

Alle Nährmedien, einschließlich der saponinhaltigen, wurden 30 Min. bei 1 atü im Autoklaven sterilisiert ⁺). Gelegentlich gelangte das Saponin in festen Einwaagen nach vorheriger 48-stündiger Trockensterilisation bei 105° C zur Verwendung.

Die Bebrütungstemperatur betrug im allgemeinen 27° C, für *Serratia marcescens* 23° C.

4.

Eine geeignete Kontrolle des Bakterienzuwachses bot die Bestimmung der Bakterienkonzentration mittels der Trübungsmessung bzw. die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme bei der Bakterienatmung. Die Korrelation zwischen diesen beiden Größen erläuterten GREIG und HOOGERHEIDE (1941) in ihren Arbeitsberichten. Sie wiesen an verschiedenen Bakterienstämmen (u.a. *Escherichia coli*) eine Proportionalität zwischen der Sauerstoffaufnahme bei der Atmung und dem nephelometrisch be-

⁺) BLUMER (1937) konnte bei der Autoklavensterilisation keine Beeinträchtigung der wachstumsfördernden Wirkung des Saponins gegenüber *Ustilago* feststellen.

bestimmten Bakteriengehalt unter optimalen Bedingungen hinsichtlich der Sauerstoffversorgung und des Atmungssubstrates nach. Die Erfassung anderer Vergleichsgrößen, wie Stickstoffwert oder Keimzahl, war durch die Anwesenheit größerer Saponinmengen (Schaumwirkung des Saponins!) behindert.

a) Die Bakterien dichte wurde im lichtelektrischen Universalkolorimeter nach Dr. B. Lange, Modell VI, gemessen (LANGE, 1952). Der Extinktionswert (Trübungsgrad) repräsentiert den Gehalt an Bakterien in einer Suspension. Die Vergleichsproben für die Messungen enthielten jeweils eine Lösung derselben Zusammensetzung wie die entsprechenden Suspensionsmedien.

b) Die Ermittlung des Sauerstoff-Verbrauchs bei der Bakterienatmung führten wir in der Warburg-Apparatur, Modell VL, der Firma B. Braun-Melsungen anhand der manometrischen Methode durch. Dabei wird in Gegenwart von Kaliumhydroxidlösung als Absorptionsmittel für Kohlendioxid aus der Druckänderung h das Volumen des verbrauchten Sauerstoffs $x = h \cdot k$ (k = Gefäßkonstante) berechnet (vergl. BELOSERSKI und PROSKURJAKOW, 1956).

Zur Aufnahme der Bakteriensuspensionen dienten an Doppelkapillarmanometer angeschlossene kegelförmige Gefäße (Vol. ca. 15 ml) mit je einer seitlichen Ansatzbirne für das Substrat und einem mittleren Einsatz für die Kalilauge (bzw. mit 0,2 ml 10%iger Kalilauge getränkte Filterpapierröllchen). Das geheizte Wasserbad der Versuchsanordnung garantierte eine gleichmäßige Temperatur von 27° C. Die bei manchen Versuchen durch die Saponineinwaage bedingten Veränderungen des Flüssigkeitsvolumens wurden jeweils in die Gefäßkonstanten einbezogen.

48 Stunden alte Flüssigkeitskulturen von *Escherichia coli* bzw. 96 Stunden alte Kulturen des in synthetischer Nährlösung nur zögernd ankeimenden *Serratia*-Stammes wurden auf der Zentrifuge (10 000 Umdrehungen/Min.) 10 Min. sedimentiert. Der Bakterienrückstand wurde durch wiederholtes Sus-

pendieren in physiologischer Kochsalzlösung und Zentrifugieren vom Substrat gereinigt und - wenn nicht anders beschrieben - mit steriler Pufferlösung (m/15 Phosphatpufferlösung, pH 6,5) für die Atmungsversuche aufgenommen.⁺) Vor der Übertragung der Bakteriensuspensionen in die Versuchsgefäße ermittelten wir an einer Probe den Trübungsgrad.

Auf die Wahrung steriler Versuchsbedingungen wurde besonders geachtet.

5.

Mit Hilfe der P a p i e r c h r o m a t o g r a p h i e wurde der Nachweis von verschiedenen Inhaltsstoffen des Saponins, des Saponinhydrolysates und der Kulturlösungen erbracht. Wir wählten die aufsteigende eindimensionale Methode und identifizierten die gesuchten Substanzen durch gleichzeitig mit-chromatographierte Testlösungen. Als Chromatographiepapier dienten quadratische Bogen (30 cm Seitenlänge) der Sorte 2043 b der Firma Schleicher & Schüll.

Die einzelnen Verfahren werden nachstehend angeführt:

- a) Nachweis von r e d u z i e r e n d e n Z u c k e r n in Saponinlösung und Saponinhydrolysat:

Die Hydrolyse des Saponins erfolgte nach der im Erg. Bd. 6 des DAB enthaltenen Vorschrift zur Wertbestimmung des Präparates⁺⁺): 0,5 g Saponin wurden in einem Erlenmeyerkolben in 20 ml destilliertem Wasser gelöst, mit 35 ml verdünnter

⁺) Die von POSTGATE und HUNTER (1963) vorgebrachten Bedenken gegen Atmungsversuche mit Wachstumssubstanzen treffen bei den von uns gewählten Versuchsvorbereitungen und -anordnungen nicht zu.

⁺⁺) Nach derselben Methode wurde aus der 3-fachen Saponinmenge (bei gleichbleibendem Flüssigkeitsvolumen) ein Saponinhydrolysat gewonnen, das als Substrat für Versuchskulturen Verwendung fand (s.S.28).

Schwefelsäure versetzt und 8 Stunden mit aufgesetztem Trichter auf dem Wasserbad erhitzt. Das unlösliche Hydrolysat, das Sapogenin (s.S.27), schied sich ab.

Das lösliche Hydrolysat wurde mit Soda neutralisiert und neben einer 5%igen Saponinlösung und den 1%igen Vergleichszuckerlösungen auf der Startlinie des Chromatogramms aufgetragen. (Saponinhydrolysat und Saponinlösung: je 0,04 ml, Testlösungen: je 0,02 ml)

Das Laufmittelgemisch bestand aus:

70	Vol.Tln.	Isopropanol,
20	"	Eisessig,
10	"	Wasser;

der Entwickler aus einer Anilinphthalatlösung (0,93 g Anilin und 1,66 g Phthalsäure, gelöst in 100 ml wassergesättigtem Butanol, s. Merck "Chromatographie", S. 138).

Nach dem Besprühen wurden die Chromatogramme 10 Min. bei 105° C getrocknet. Die Fluoreszenz der Flecken wurde im UV-Licht festgestellt.

g) Nachweis von A n e u r i n (Vitamin B₁) in Saponinlösung, Saponinhydrolysat und Kulturlösungen:

Zur Aufbereitung aneurinhaltiger pflanzlicher Materialien führt PAECH-TRACEY (1955, Bd.IV, S. 353) ein Extraktionsverfahren mit verdünnter Säure an: 10 g biologisches Material werden mit etwas konzentrierter Salzsäure verrührt, mit 30 bis 40 ml Wasser behandelt und 10 Min. auf dem Wasserbad erhitzt. Wir verwendeten stattdessen 1 g Saponin, 1 ml konz. Salzsäure und 20 ml aqua bidest.. Der unlösliche Rückstand wurde abfiltriert, das Hydrolysat mit Soda neutralisiert und mit Essigsäure wieder schwach angesäuert. Außer dem Hydrolysat chromatographierten wir eine schwach essigsäure 5%ige Saponinlösung, Kulturlösungen und zum Vergleich ebenfalls angesäuerte Aneurinlösungen mit 1 γ Aneurin/ml bzw. 100 γ Aneurin/ml. (Saponinhydrolysat, Saponin- und Kulturlösungen: je 0,04 ml, Testlösungen: je 0,03 ml)

Das bei LINSKENS (1959, S. 285 ff.) benannte Laufmittel

setzt sich zusammen aus:

30	Vol.Tln.	Isobutanol,
20	"	Pyridin,
50	"	Wasser.

Die Sichtbarmachung der Flecken erfolgte mittels der Thiochromreaktion (Oxydation mit einem Gemisch aus 1 Vol.Tl. 1%iger Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung und 25 Vol.Tln. 0,5 n methanolischer Natronlauge). Sie zeigten nach dem Trocknen im UV-Licht hellblaue Fluoreszenz.

- c) Nachweis von A m i n o s ä u r e n in den Kulturlösungen:
Die 1%igen Testlösungen wurden zu 0,02 ml auf die Startpunkte aufgetragen, die Kulturlösungen zu 0,04 ml.

Als Laufmittel verwendeten wir ein Gemisch aus:

70	Vol.Tln.	α -Picolin,
28	"	Wasser,
2	"	konz. Ammoniumhydroxid.

Entwickelt wurde mit Ninhydrin (150 mg Ninhydrin und 50 ml 95%iges Aethanol, angesäuert mit 2 Tropfen verdünnter Salzsäure) und nachträglicher Wärmeeinwirkung (30 Min. bei 80° C).

6.

Die Ermittlung des S t i c k s t o f f g e h a l t e s im Saponinpräparat wurde entsprechend der in PAECH-TRACEY (1956, Bd.I, S. 479 ff.) angegebenen Vorschrift nach dem Kjeldahl-Verfahren durchgeführt, die quantitative Bestimmung der r e d u z i e r e n d e n Z u c k e r im Saponinpräparat bzw. -hydrolysat nach Bertrand (BÖMER, JUCKENACK und TILLMANS, 1935, Bd.II, S. 864).

7.

Das Verfahren zur E x t r a k t i o n des roten F a r b - s t o f f e s (Prodigiosin) von Serratia marcescens gliederte sich in folgende Arbeitsgänge:

) **Anzucht der Bakterien:**

Wir ließen in 4 sterilen Petrischalen je 20 ml synthetischen Nähragar zusätzlich 0 - 0,1 - 1 bzw. 5% Saponin erstarren und beschickten die Platten mit in je 1 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung suspendierten Bakterien des Anzuchtstammes *Serratia marcescens* (O). Zur gleichmäßigen Verteilung der Suspensionen auf der Oberfläche der Nährböden wurden die Platten leicht geschwenkt und anschließend in einem verdunkelten Brutraum (23° C) auf eine Schüttelmaschine gesetzt.

) **Ernte der Bakterien und Verarbeitung der Bakterienmasse bzw. des Nähragars:**

Sobald die Kulturen einen gleichmäßigen Bewuchs und eine deutliche Pigmentbildung (letzteres in der Regel nach 8 Tagen) erkennen ließen, wurden die Bakterien mit einem Spatel vorsichtig vom Nährmedium abgehoben und der Nährboden mehrmals rasch mit bidestilliertem Wasser abgespült. (Die Konsistenz des synthetischen Nährbodens ermöglichte eine genaue Trennung von Bakterien und Nährmedium.) Die mit der Waschflüssigkeit vereinigte Bakterienmasse wurde in einem Homogenisator (Firma Edmund Bühler, Tübingen) 10 Min. bei maximal 40 000 Umdrehungen/Min. behandelt.

Das Bakterienhomogenisat überführten wir daraufhin quantitativ in einen 50 ml fassenden Meßkolben und füllten diesen mit aqua bidest. auf das Volumen auf.

Der Nähragar wurde in gleicher Weise im Homogenisator verarbeitet. Die starke Schaumbildung beim Homogenisieren konnte durch Zusatz von 1-2 Tropfen Silicon-Antischaumemulsion SE 2 (Wacker-Chemie München ⁺) unterdrückt werden.

) **Alkalische Extraktion (nach WREDE und HETTICHE, 1929):**

Nach der Zugabe von 10 Gew.% festem Natriumhydroxid zum

) Wir danken der Firma Wacker-Chemie München für die kostenlose Überlassung der Antischaumemulsion.

Homogenisat (Bakterien bzw. Nähragar) blieb das Reaktionsgemisch 2 Stunden unter öfterem Schütteln stehen. Dann folgte der Zusatz von gleichen Volumteilen absoluten Aethanols und Petroläthers (Sdp. 40 bis 60° C). Der ätherlösliche Farbstoff wurde wiederholt mit Petroläther aus der alkalischen Wasser-Aethanol-Phase ausgeschüttelt. Aus den gesammelten Petrolätherfraktionen wurde anschließend das Pigment mit einem kleinen Volumen 85%igem Aethanol, angesäuert mit 1% Eisessig, extrahiert.

Die so gewonnenen, von den Serratia-Pigmenten tiefrot gefärbten Extrakte wurden mit dem Lösungsmittel (essigsaures Aethanol) auf 50 ml aufgefüllt. Zur Identifizierung des Pigmentes bestimmten wir im Beckman-Spektralphotometer Modell B das Absorptionsspektrum.

Als Maß für den Pigmentgehalt der extrahierten Bakterien bzw. der Nährböden wurde die Farbintensität der einzelnen Proben beim Absorptionsmaximum (535 bis 540 nm) des Farbstoffes gemessen.

8.

Die p H - M e s s u n g e n wurden zum Teil mit pH-Papier (Lyphan) durchgeführt, zum Teil unter Verwendung eines pH-Meßgerätes mit Mikroelektroden der Firma Püsl.

C. Versuchsergebnisse

I.

Einfluß von Saponin (p.a. Merck) auf Wachstum und Atmung von Bakterien, insbesondere von Escherichia coli und Serratia marcescens

Gelegentlich konnten wir beobachten, daß Bakterienkolonien auf festen, saponinhaltigen Nährböden ein üppiges Wachstum und eine feuchtglänzende, "zerfließende" Oberfläche aufwiesen:

Unter dem Mikroskop (bis zu 1 200-fache Vergrößerung) zeigten mit Karbolfuchsin gefärbte bzw. Tuscheausstrichpräparate von 24 Stunden alten, auf Saponin gezüchteten Bakterien keine wesentliche Vergrößerung oder Veränderung des Zellkörpers gegenüber saponinfrei kultivierten Bakterien. Lediglich die Form der Zellverbände variierte bei manchen Stämmen, eine häufige substratbedingte Erscheinung.

1. Verwertung von Saponin (Merck) als Kohlenstoffquelle

Zunächst wurde verschiedenen Bakterienstämmen eine 1%ige Lösung von Saponin in destilliertem Wasser als flüssiges Substrat geboten. Nach 12-stündiger Bebrütungsdauer war an den Kulturlösungen von Escherichia coli, Aerobacter aerogenes und Serratia marcescens eine deutliche Trübung zu beobachten. Bei Serratia marcescens setzte außerdem nach 8 Tagen die Pigmentbildung ein. Die drei genannten Stämme vermögen demnach Saponin als a l l e i n i g e Nährstoffquelle zu verwerten.

Um das Wachstum von Bakterien auf Saponinmedien etwas genauer zu erfassen, sollten in einem weiteren Vorversuch mehrere Bakterienstämme in saponinhaltigen Nährlösungen (also nun unter optimalen Bedingungen) kultiviert und nach 6 bzw. 24 Stunden Inkubationszeit die Suspensionsdichte (Bakterienkon-

zentration) nephelometrisch bestimmt werden. Impfgut der gewählten Bakterienstämme wurde in je 200 ml sterile Cenovis-Nährlösung eingesät und zur Erzielung einer gleichmäßigen Bakteriensuspension auf der Schüttelmaschine bei 27° C bebrütet. Nach 16 Stunden wurde jede dieser Flüssigkeitskulturen unter sterilen Bedingungen auf je 4 Erlenmeyerkölbchen mit 0 - 1 - 5 bzw. 10% Saponineinwaage verteilt. Nach weiteren 6 bzw. 24 Stunden Wachstum auf der Schüttelmaschine erfolgte die Probenentnahme und die Bestimmung der Suspensionsdichte als Maß für den Zuwachs im lichtelektrischen Universalcolorimeter nach Lange.

Einige Mikroorganismen (*Bacterium vulgare*, *Bacillus mesentericus* und *Bacillus mycoides*) mußten von vorneherein ausgeschieden werden, weil sich die Einzelindividuen zu groben Flocken zusammenballten und dadurch einer Trübungsmessung unzugänglich waren.

Die Versuche ergaben eine bessere Vermehrung der Bakterien in saponinhaltigen Medien.

Um die tatsächliche Größe des Zuwachses zu berechnen, wurden von den nach 6 bzw. 24 Stunden gemessenen Extinktionswerten jeweils die zum Zeitpunkt des Saponinzusatzes ermittelten Werte abgezogen. In der folgenden Tabelle 1 wurde der höchste Extinktionswert innerhalb einer Saponinkonzentrationsreihe = 100 gesetzt und die anderen Werte auf diese Einheit bezogen.

Tabelle 1: Zuwachs von Bakterien in saponinhaltiger Cenovis-Nährlösung (Erklärung siehe Text)

Bakterienstamm:	Saponingehalt der Kulturlösung (%):							
	0	1	5	10	0	1	5	10
	(nach 6 Stunden)				(nach 24 Stunden)			
<i>Serratia marc.</i> ^{o)}	69	100	(79)	(86)	62	100	(50)	(41)
<i>Escherichia c.</i>	44	57	100	91	41	49	100	81
<i>Bacillus subt.</i>	62	76	100	78	80	91	100	75
<i>B. subt. Pen. empf.</i>	65	72	100	89	87	95	100	83
<i>B. subt. P.+St. empf.</i>	54	71	100	83	88	96	100	83
<i>Micrococcus lut.</i>	48	95	100	99	42	87	100	100

^{o)} Die genauen Werte sind durch die Farbstoffabgabe an das Medium beeinträchtigt.

Zwei der geprüften Stämme, *Escherichia coli* und *Serratia marcescens*, wurden für alle weiteren Untersuchungen beibehalten.

Den Bakterien wurde wiederum Saponin in steigenden Konzentrationen (0,1 bis 20%) als alleiniges Substrat angeboten. Die Kontrolle des Bakterienwachstums basierte nunmehr aber auf der Messung des Sauerstoffverbrauchs bei der Atmung mit der manometrischen Methode in der Warburg-Apparatur (s.S.7).

Zu klären waren folgende Fragen:

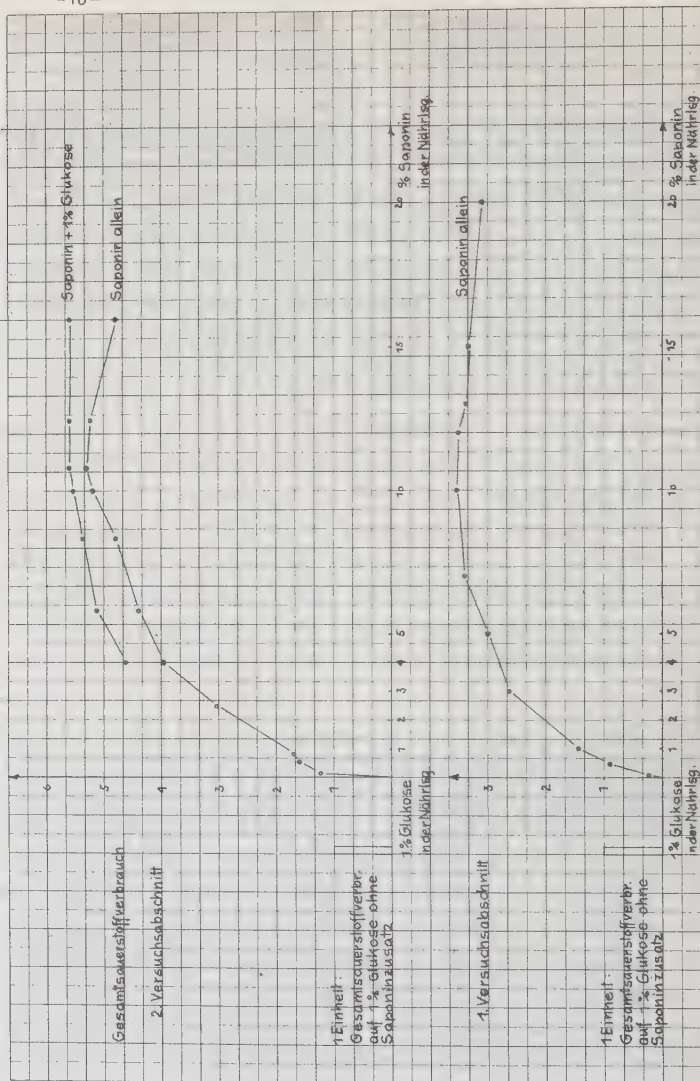
1. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Saponinkonzentration in der Nährlösung und dem Sauerstoffverbrauch bei der Bakterienatmung?
2. Erreicht der Sauerstoffverbrauch bei der Bakterienatmung auf Saponinsubstrat eine Größe, die dem Sauerstoffverbrauch auf 1%igem Glukosesubstrat vergleichbar ist?
4. Kann der Sauerstoffverbrauch auf Saponin durch zusätzliche Glukosegabe noch gesteigert werden?

Für Durchführung der Versuche wurden in die Warburggefäße unterschiedliche Saponinmengen eingewogen, so daß die Saponinkonzentrationen in den später zugefügten Bakteriensuspensionen zwischen 0,1 und 20% betrugen. Je 2 Gefäße (a und b) enthielten die gleiche Saponineinwaage, die seitlichen Ansatzbirnen der Gefäße a je 0,5 ml Pufferlösung, die der Gefäße b je 0,5 ml Glukose-Phosphatpuffer-Lösung (genügend konzentriert, um die Bakteriensuspension nach dem Einkippen mit 1% Glukose zu versorgen). Die für den Versuch bereitgehaltene Bakterienmasse wurde in Pufferlösung suspendiert und die Dichte der Suspension durch Trübungsmessung ermittelt.

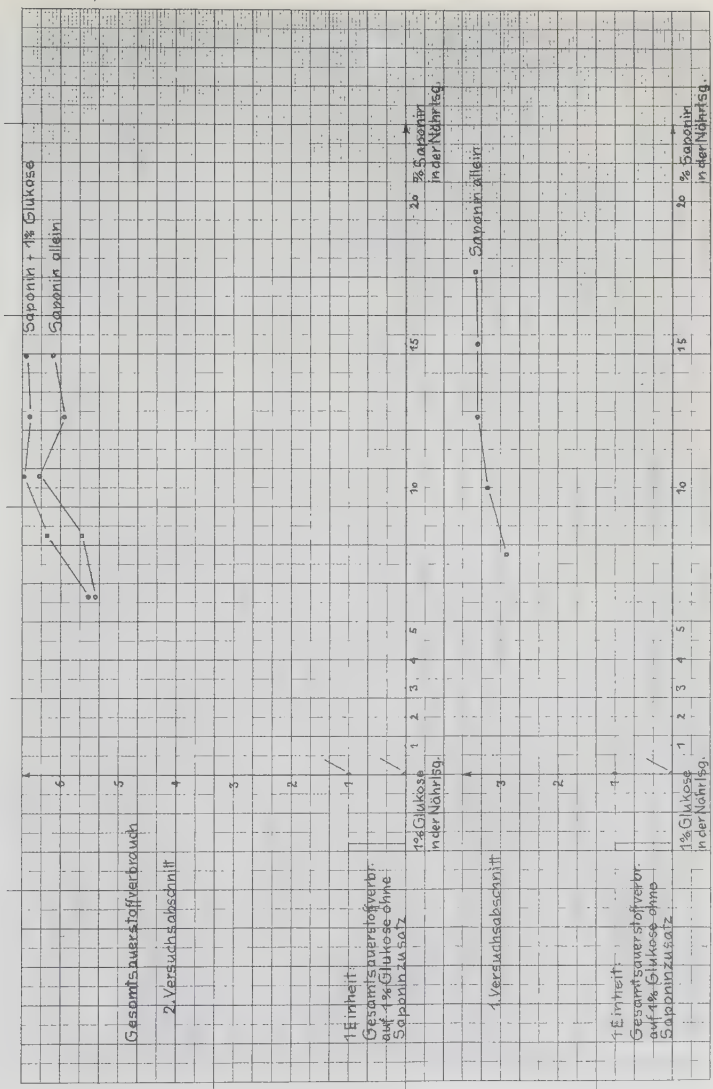
Dann wurden je 2,5 ml dieser Bakteriensuspension in die einzelnen Warburggefäße übertragen.

Nach 150 Min. Versuchsdauer (1. Versuchsabschnitt) wurde der Inhalt der Ansatzbirnen den Reaktionsgefäßen zugekippt. Den Proben b standen während der folgenden 150 Min. Versuchszeit

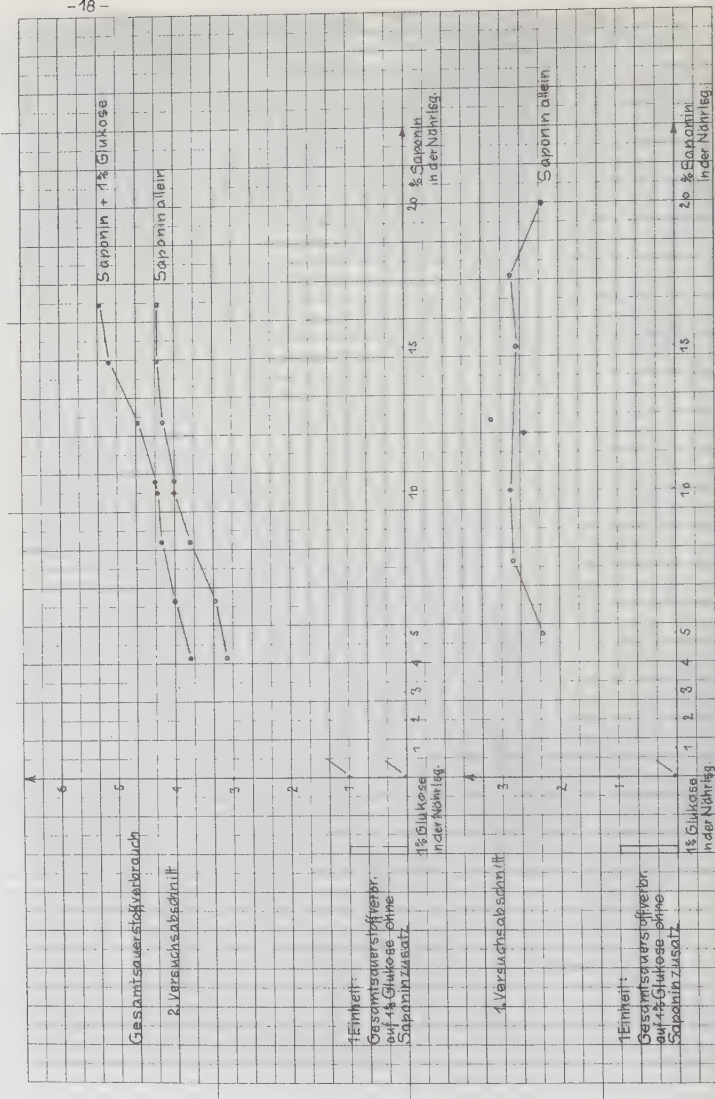
Figur 1: Sauerstoffverbrauch bei der Atmung von *Escherichia coli* (O) in saponinhaltenen bzw. saponin- und glukosehaltigen Nährmedien (m/15 Phosphatpuffer: Saponinkonzentrationen zwischen 0,1 und 20%, Glukosekonzentration 1%)
Anmerkung: Die im 2. Versuchsabschnitt durch Zugabe der Glukose-
lösung verringerten Saponinkonzentrationen wurden bei der Berechnung der Werte berücksichtigt.
Erklärung: Siehe Text S. 15 und S. 20



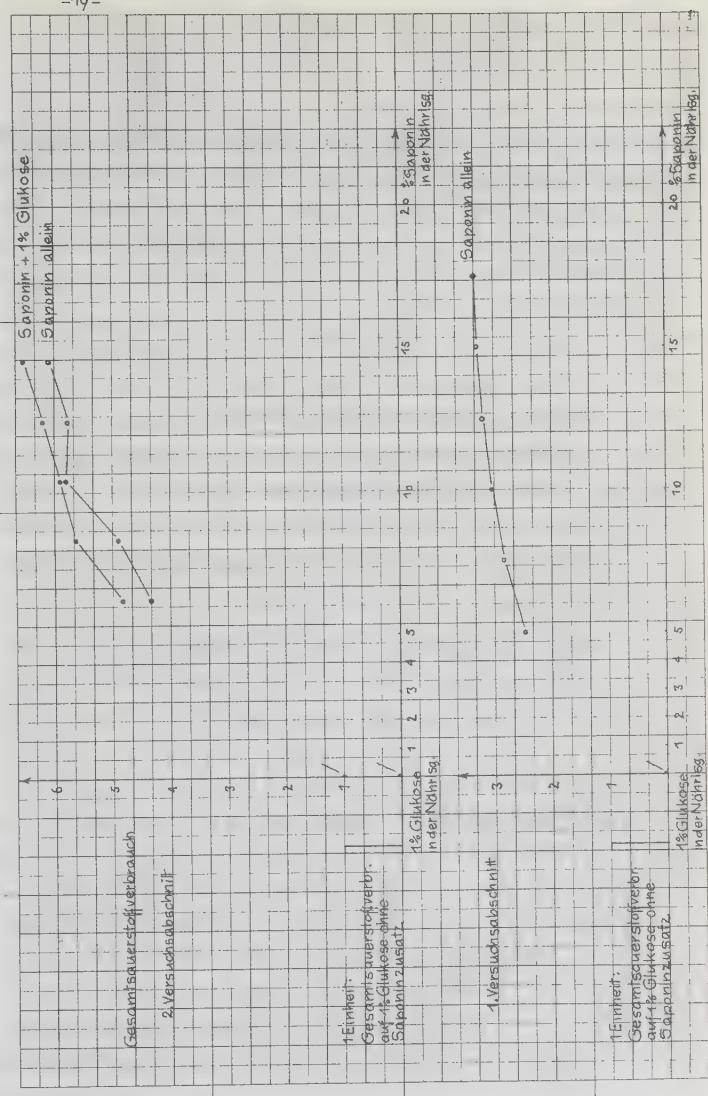
47) Saponin- und Glukosekonzentrationen zwischen 0,1 und 20%,
 Glukosekonzentration 1%
 Anmerkung: Die im 2. Versuchsabschnitt durch Zugabe der Glukose-
 lösung verringerten Saponinkonzentrationen wurden bei
 der Berechnung der Werte berücksichtigt.
 Erklärung: Siehe Text S. 15 und S. 20



Figur 3: Sauerstoffverbrauch bei der Atmung von *Serratia marcescens* (O) in saponinhaltingen bzw. saponin- und glukosehaltigen Nährmedien (m/15 Phosphatpuffer; Saponinkonzentrationen zwischen 0,1 und 20%, Glukosekonzentration 1%).
Anmerkung: Die im 2. Versuchsabschnitt durch Zugabe der Glukose- lösung verringerten Saponinkonzentrationen wurden bei der Berechnung der Werte berücksichtigt.
Erklärung: Siehe Text S. 15 und S. 20



Figur 4: Der Atmung von *Serratia marcescens* (5) in saponinhaltingen bzw. saponin- und glukosehaltigen Nährmedien (m/15 Phosphatpuffer; Saponinkonzentrationen zwischen 0,1 und 20%, Glukosekonzentration 1%)
 Anmerkung: Die im 2. Versuchsabschnitt durch Zugabe der Glukose- lösung verringerten Saponinkonzentrationen wurden bei der Berechnung der Werte berücksichtigt.
 Erklärung: Siehe Text S. 15 und S. 20



(2. Versuchsabschnitt) als zusätzliche Kohlenstoffquelle 1% Glukose zur Verfügung, den Proben a weiterhin nur Saponin. In den Figuren 1 bis 4 wurden die Ergebnisse dieser Versuche zusammengestellt. Die Erklärung folgt mit der Besprechung der Ergebnisse. Wir gehen dabei zugleich auf die auf S.15 gestellten Fragen ein:

- ad 1) Alle in den Fig. 1 bis 4 dargestellten Kurven zeigen eine Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs bei der Atmung vom Saponingehalt des Nährmediums: Mit zunehmender Saponinkonzentration erhöht sich die Atmungsintensität der Bakterien ⁺⁾ .
- ad 2) Bei sämtlichen untersuchten Stämmen - *Escherichia coli* (0), *Escherichia c.* (5), *Serratia marcescens* (0), *Serratia m.* (5) - genügte eine Saponingabe von höchstens bis zu 2%, um die gleiche Atmungsgröße zu erzielen wie auf einem 1%igen Glukosenährmedium. Zur Verdeutlichung wurde in der graphischen Darstellung der Wert des Sauerstoffverbrauchs auf 1% Glukose als Einheit für den Sauerstoffverbrauch auf den unterschiedlichen Saponinnährmedien gewählt. Höhere Saponinkonzentrationen führten zu Atmungsleistungen der Bakterien, die während des 1. Versuchsabschnittes (0 bis 150 Min.) die Glukoseatmung um das 3- bis 3 1/2-fache überstiegen, während des 2. Versuchsabschnittes (150 bis 300 Min.) sogar um das 4- bis 6-fache.
- ad 3) Im 2. Versuchsabschnitt konnte durch Zugabe von 1% Glukose zu einem Teil der saponinhaltigen Proben ein Vergleich der Atmung auf Saponin bzw. auf Saponin und Glu-

⁺⁾ Auffallend war außerdem der gegenüber den normalen Kulturen höhere Sauerstoffverbrauch der auf Saponin vorkultivierten Stämme *E. coli* (5) und *Serr. marc.* (5). Vermutlich konnte das Saponin bei der Reinigung der Vorkulturen nicht restlos aus der Bakterienmasse entfernt werden.

kose angestellt werden: Selbst die durch hohe Saponinkonzentrationen stark vermehrte Bakterienatmung läßt sich durch Glukosezusatz weiter steigern.

Zusätzlich sei bemerkt, daß der pH-Wert vor und nach dem Versuch keinerlei Veränderung zeigte.

Ähnliche Beobachtungen machte BLUMER (1937) an Kulturen von *Ustilago violacea* auf Saponinmedium: In Gegenwart von 0,5% Saponin und 1% Glukose fand er Wachstumszunahmen, die eine additive Wirkung der beiden Substanzen weit übertrafen. Eine gleichstarke Wirkung ließ sich bei den Bakterienkulturen nicht feststellen, wobei jedoch zu berücksichtigen ist, daß wir zur Bestimmung dieses Einflusses nicht, wie BLUMER, den Trübungsgrad, sondern den Sauerstoffverbrauch ermittelten.

Wie aus den Ergebnissen der bisherigen Versuche (s. Tab.1, Fig. 1 bis 4) ersichtlich ist, werden der Zuwachs und die Bakterienatmung unter Saponineinwirkung wesentlich erhöht. Die maximalen Werte wurden jedoch bei unterschiedlichen Saponinkonzentrationen erreicht.

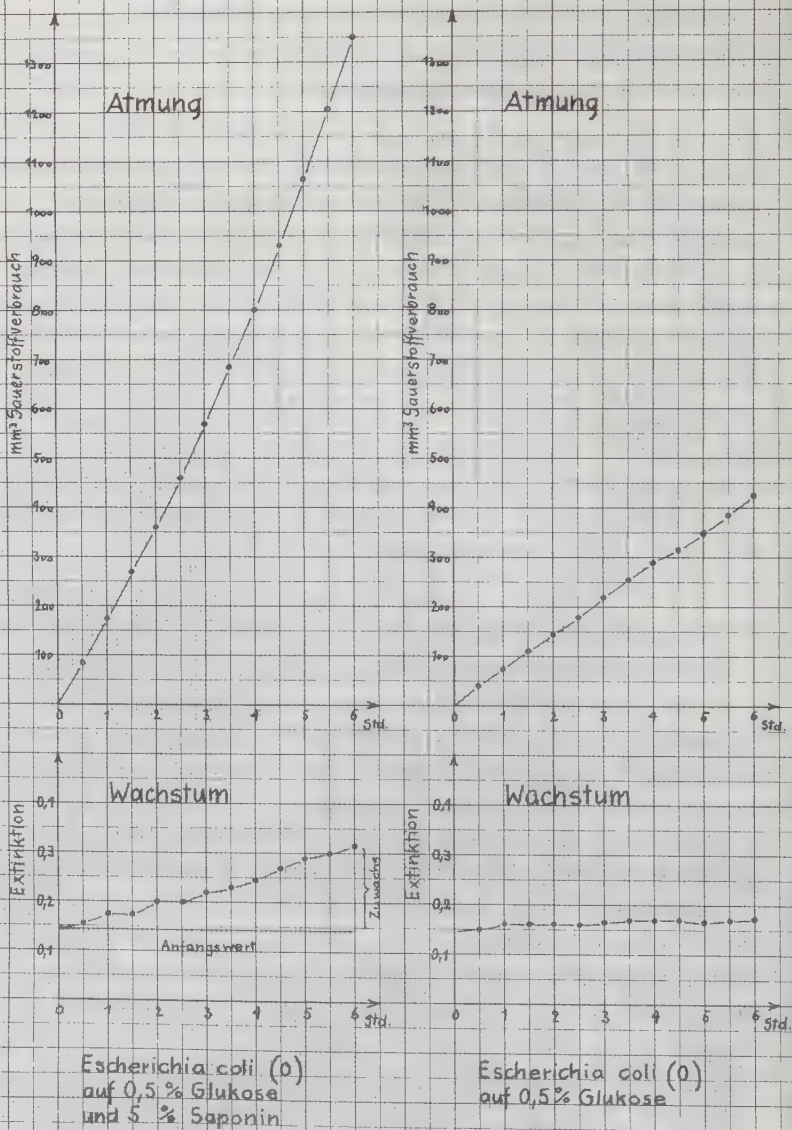
2. Vergleichende Versuche über die Bakterienatmung und das Bakterienwachstum auf Saponin (Merck) bzw. Glukose

In einer weiteren Versuchsreihe sollten der zeitliche Verlauf der Bakterienatmung (Sauerstoffverbrauch) und des Bakterienwachstums (Trübungsgrad) bei einer gegebenen Saponinkonzentration (5%) ⁺⁾ beobachtet werden.

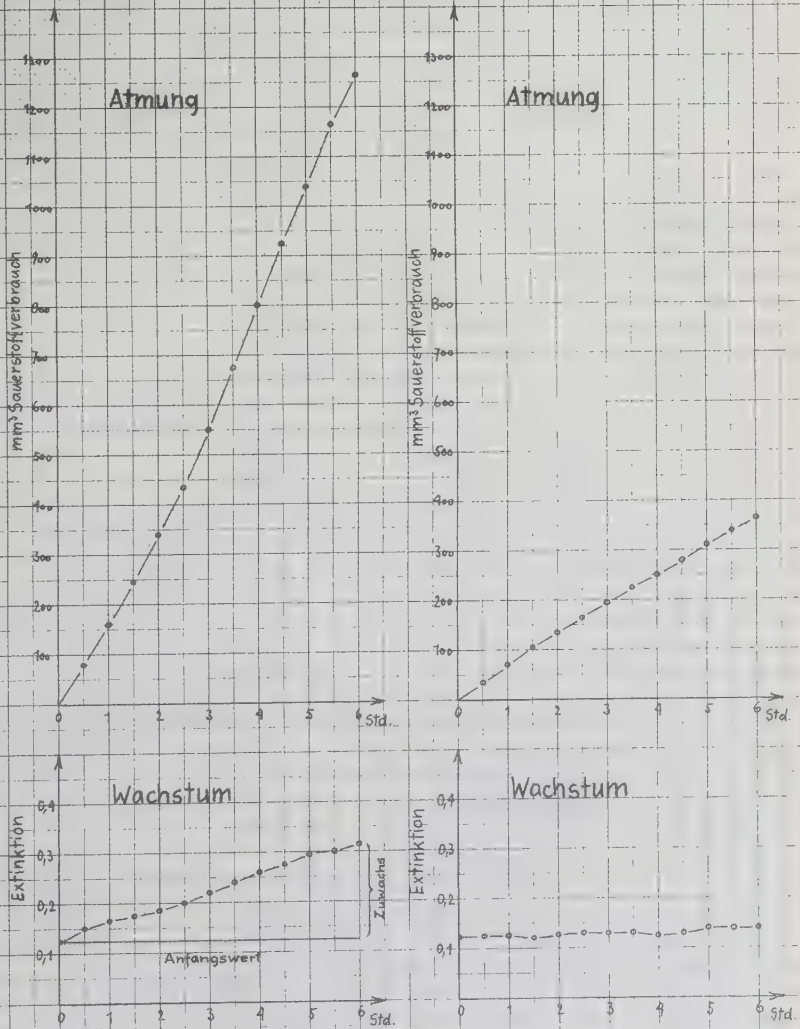
Je 3 ml einer Bakteriensuspension in Phosphatpufferlösung von bekannter Dichte wurden in die Versuchsgefäße übertragen. Das Substrat setzte sich aus 0,5% Glukose und 5% Saponin zusammen. Während eines Zeitraumes von 6 Stunden wurde in Abständen von 30 Min. nach Ablesung der manometrischen Druckverminderung jeweils ein Gefäß aus der Warburg-Apparatur entnommen zur

⁺⁾ Es wurde eine Saponinkonzentration gewählt, bei welcher die das Bakterienwachstum repräsentierenden Bestimmungsgrößen, Sauerstoffverbrauch und Trübungsgrad, noch nicht ihren Höchstwert erlangt hatten.

Figur 5: Atmung (Sauerstoffverbrauch) und Wachstum (Trübungsgrad) von *Escherichia coli* (0) auf Saponin- bzw. Glukosemedium



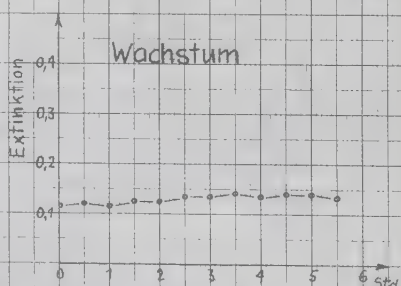
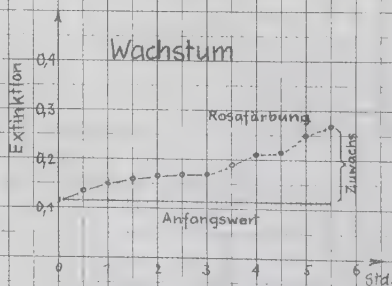
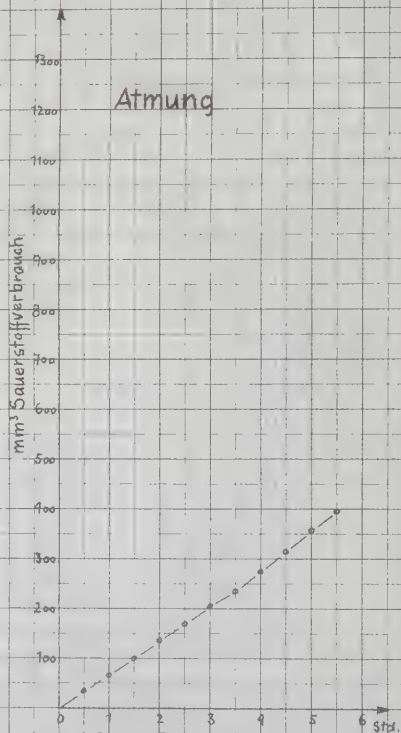
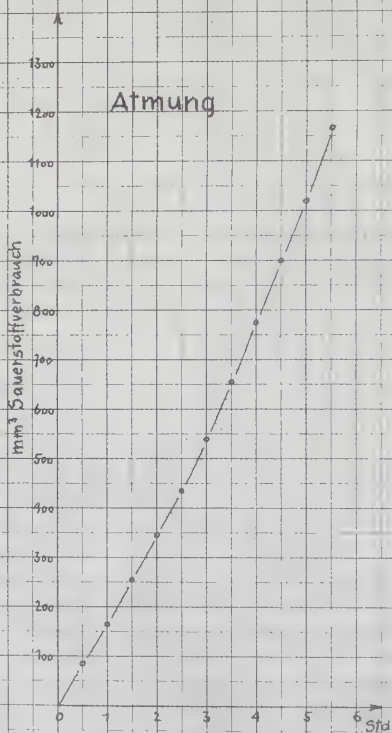
Figur 6: Atmung (Sauerstoffverbrauch) und Wachstum (Trübungsgrad) von *Escherichia coli* (5) auf Saponin- bzw. Glukosemedium



Escherichia coli (5)
auf 0,5% Glukose
und 5 % Saponin

Escherichia coli (5)
auf 0,5% Glukose

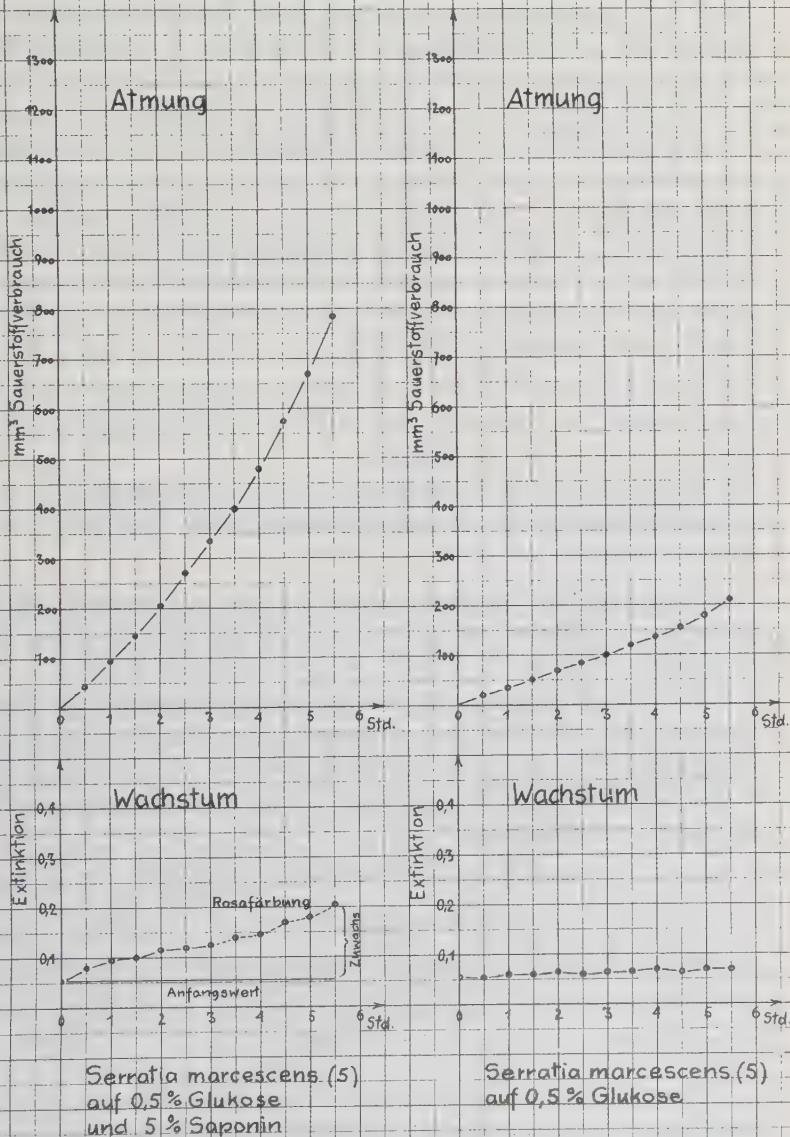
Figur 7: Atmung (Sauerstoffverbrauch) und Wachstum (Trübungsgrad) von *Serratia marcescens* (0) auf Saponin- bzw. Glukosemedium



Serratia marcescens (0)
auf 0,5 % Glukose
und 5 % Saponin

Serratia marcescens (0)
auf 0,5 % Glukose

Figur 8: Atmung (Sauerstoffverbrauch) und Wachstum (Trübungsgrad) von *Serratia marcescens* (5) auf Saponin- bzw. Glukosemedium



Trübungsmessung. In einer zweiten Warburg-Apparatur bestimmten wir auf dieselbe Weise den Sauerstoffverbrauch und die Extinktionswerte von weiteren Proben der Bakterien-suspension, denen jedoch nur 0,5% Glukose - also kein Saponin - als Substrat angeboten wurden. Dadurch konnten wir einerseits die Beziehung zwischen Atmungsgröße und Wachstum der Bakterien auf einem bestimmten Substrat verfolgen und andererseits die Abhängigkeit dieser Größen vom jeweiligen Substrat. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Fig. 5 bis 8 an je 2 Beispielen aufgezeigt. Die Trübungsmessungen an *Serratia marcescens* wurden durch die zunehmende Farbstoffdiffusion ins Medium erschwert, bzw. gegen Ende der Versuche unmöglich.

Auf Glukosenährmedium erhöhte sich der Sauerstoffverbrauch von Ablesung zu Ablesung gleichmäßig, auf Saponin-Glukose-Nährmedium dagegen zunehmend.

Die Bakteriendichte erreichte auf Glukosenährmedium nach etwa 2 Stunden einen gleichbleibenden Wert, auf Saponin-Glukose-Nährmedium stieg sie weiter an.

Diese substratbedingten Unterschiede bei der Atmung und beim Wachstum der Bakterien lassen sich durch eine zahlenmäßige Gegenüberstellung (s. Tab.2) noch verdeutlichen:

Wir setzten Atmung und Wachstum einer 6 Stunden lang kontrollierten Bakteriensuspension (siehe die oben beschriebenen Versuche), d.h. also den gesamten Sauerstoffverbrauch während dieser Zeit und den zuletzt bestimmten Extinktionswert, zueinander in Beziehung:

$$\frac{\text{Gesamtsauerstoffverbrauch (mm}^3\text{)}}{\text{Extinktion}}$$

Dieser Zahlenwert ist größer bei Bakterien, die auf Glukose kultiviert wurden.

Tabelle 2: Bakterienatmung und -wachstum auf Glukose bzw. Saponin-Glukose-Medium (innerhalb von 6 Stunden)

Organismen:	<u>Gesamtsauerstoffverbrauch (mm³):</u>	
	Extinktion	
	Substrat: m/15 Phosphatpuffer 0,5% Glukose ^{o)} -	Substrat: m/15 Phosphatpuffer 0,5% Glukose 5 % Saponin
Escherichia c.(0)	15,3 · 10 ³	7,2 · 10 ³
	16,2 · 10 ³	6,8 · 10 ³
	18,8 · 10 ³	7,6 · 10 ³
	19,2 · 10 ³	8,1 · 10 ³
	18,7 · 10 ³	8,3 · 10 ³
Escherichia c.(5)	20,0 · 10 ³	8,8 · 10 ³
	13,9 · 10 ³	7,8 · 10 ³
	21,0 · 10 ³	7,3 · 10 ³

- o) Die relativ große Streuung ist eine Folge der bei der Berechnung ins Gewicht fallenden geringen Unterschiede für den Bakterienzuwachs auf Glukosesubstrat.

3. Mögliche Ursachen der wachstumsfördernden Wirkung von Saponin (Merck) für Escherichia coli und Serratia marcescens

a) Eignung des Saponins (Merck) als Nährstoff

Es werden zwei Gruppen von Saponinen mit sehr ähnlichen physikalischen und physiologischen, teils auch chemischen Eigenschaften unterschieden: die sauren triterpenoiden und die neutralen, den Herzgiften nahestehenden, steroiden Saponine. Beide sind Glykoside, die durch Hydrolyse in ein unlösliches Aglykon, das jeweilige Sapogenin, und einen löslichen Glykonrest unterschiedlicher Zusammensetzung zerlegt werden können.

Nach KARRER (1958) gehört das Gypsophilasaponin zu den Triterpenabkömmlingen, es besteht aus dem eine Karboxylgruppe enthaltenden Sapogenin Gypsogenin ($C_{30}H_{46}O_4$)⁺ sowie den Pentosen Arabinose, Rhamnose und den Hexosen Glukose und Galaktose.

SCHOPFER (1937) und BLUMER (1937, gemeinsam 1938) kamen bei

⁺) Das Gypsogenin bildet das Aglykon vieler in Caryophyllaceen vorkommender Saponine.

ihren Untersuchungen über die Biologie von *Ustilago violacea* zu der Feststellung, daß das von ihnen im Substrat verwendete Saponinpräparat (Gypsophilasaponin) eine wachstumsfördernde Wirkung auf den Pilz ausübe. Ihre eingehenden Versuche führten zu dem Ergebnis, daß eine alkohollösliche, thermostabile Substanz, eine Verunreinigung des Präparates, für den Wachstumseffekt verantwortlich und daß diese Substanz mit dem Aneurin (Vitamin B₁) gleichzusetzen sei. Ein sicherer direkter Nachweis des Aneurins gelang nicht, da die im Saponin vorhandenen geringen Mengen mit den damals gebräuchlichen Testmethoden nicht zu erfassen waren. Auf die uneinheitliche Natur des Merck'schen Saponinpräparates wurde bereits hingewiesen (vergl. S.5).

Wir überprüften in der vorliegenden Arbeit einige im Saponinpräparat bzw. -hydrolysat enthaltenen Stoffe auf ihre Nährstoffeignung gegenüber Bakterien.

aa) Atmung von *Escherichia coli* und *Serratia marcescens* auf Saponinhydrolysat

Saponin wurde nach dem auf S.8 angegebenen Verfahren mit verdünnter Schwefelsäure hydrolysiert. Der weiße unlösliche Rückstand, das Sapogenin, wurde abfiltriert, auf der Nutsche mit sodahaltigem Wasser gewaschen, bis das Filtrat keine Säurereaktion mehr zeigte, und bei 105° C im Thermostaten getrocknet.

Die Eignung des Sapogenins als Substrat für Bakterien sollte der Atmungsversuch erweisen:

In je 2 Warburggefäße wurden gleiche Mengen Sapogenin eingewogen (zwischen 0,3 und 3%). In den Ansatzbirnen der Gefäße mit gleicher Einwaage waren 0,5 ml Pufferlösung bzw. 0,5 ml Glukose-Phosphatpuffer-Lösung (1% Glukose) enthalten, die bei Versuchsbeginn den Bakterien-suspensionen und dem Sapogenin im Hauptgefäß zugekippt wurden.

Auf bloßem Sapogeninsubstrat wurden höchstens 5% der Atmungsintensität auf Glukosesubstrat erreicht. Der Zu-

satz von Sapogenin zum Glukosesubstrat hatte keine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs zur Folge. Die Sapogenine besitzen demnach keine Nährstoffeigenschaften gegenüber den untersuchten Bakterienstämmen⁺).

Die lösliche Fraktion des Hydrolysates eignete sich nach der Neutralisation mit festem Natriumkarbonat nicht mehr als Substrat für Atmungsversuche. Wir versuchten deshalb zunächst einige Inhaltsstoffe dieser Fraktion näher zu bestimmen.

bb) Nachweis von reduzierenden Zuckern im Saponinhydrolysat

Die quantitative Bestimmung der reduzierenden Substanzen nach Bertrand ergab (in Dextrosewerten ausgedrückt):

freie reduzierende Zucker	2,3-2,9%	bezogen auf die Trockensubstanz
(in der wässrigen Lösung des Saponinpräparates)		(Wassergeh. 7 bis 8%)

freie und an Saponin gebundene Zucker	50-57%	"
(im Saponinhydrolysat ⁺⁺)		

Beim chromatographischen Zuckernachweis im Saponin wurden folgende Zucker als Testsubstanzen verwendet:

die Hexosen Glukose, Fruktose, Galaktose,
die Pentosen Ribose, Arabinose, Rhamnose,
die Uronsäuren Glukuronsäure und Galakturonsäure.

In Fig. 9 wurden 2 Chromatogramme in Originalgröße zum besseren Vergleich in einer Zeichnung zusammengefaßt.

In der Wanderzone der Saponinlösung wurden nach dem Anfärben keine Flecken sichtbar.

Das neutralisierte Hydrolysat ließ nach dem Entwickeln vier deutliche Farbflecken erkennen, die nach Farbton

⁺) Nach den Feststellungen von SANNIÉ (1948) sind im allgemeinen die Eigenschaften der Saponine in den entsprechenden Sapogeninen nur ganz schwach oder überhaupt nicht ausgeprägt.

⁺⁺) hergestellt nach der Vorschrift im DAB Erg. Bd. 6, vergl. S. 8

Figur 9: Papierchromatogramm
zum Nachweis von
reduzierenden Zuckern

Laufmittelfront

Testsubstanzen:

- (1) Glukose
- (2) Galaktose
- (3) Arabinose
- (4) Rhamnose
- (5) Gemisch

zu prüfende Substanzen:

- (6) saures Saponinhydrolysat
- (7) neutralisiertes Saponin-
hydrolysat
- (8) Saponinlösung

zu prüfende Kulturlösungen:

- (9) von *Escherichia coli* bzw.
Serratia marcescens ohne
Saponin
- (10) von *Escherichia coli* bzw.
Serratia marcescens mit
5% Saponin

Laufmittel: Isopropanol (70)
Eisessig (20)
Wasser (10)

Entwickler: Anilinphthalat

Farben:  gelbbraun
(Fluoreszenz gelb)
 rot
(Fluoreszenz rötlich)
 rosa
 nicht angefärbt
(Fluoreszenz hellblau)



und Fluoreszenz mit den Testsubstanzen Glukose, Galaktose, Arabinose und Rhamnose zu identifizieren waren. Einen fünften, weniger ausgeprägten, schwach rosa gefärbten Fleck könnte man als zum roten Arabinose-Fleck zugehörig ansprechen. Da er aber in der Wanderzone des sauren Hydrolysates isoliert, nicht weit vom Startpunkt entfernt, hinter den anderen Zuckern zurückblieb, muß man diesen Fleck wahrscheinlich einer fünften reduzierenden Substanz zuschreiben.

Die vier eindeutig nachgewiesenen Zucker stimmen mit den Angaben in der Literatur überein (KARRER, 1958). Enzymatische Saponinspaltungen durch Bakterien wurden des öfteren erwähnt (s.S.3). Wir untersuchten deshalb gleichzeitig saponinhaltige Kulturlösungen der Bakterien auf ihren Zuckergehalt.

Diese Saponinkulturlösungen (mit 0 - 0,1 - 1 und 5% Saponin) wurden durch Zentrifugieren von den 5 Tage alten Bakterien abgetrennt und für die Chromatographie vorbereitet. Sie wurden nach demselben Verfahren chromatographiert. Für ein Auftreten von freien Zuckern in den Kulturlösungen fand sich kein Hinweis.

Dagegen war in der Nähe des Startpunktes ein in der Laufrichtung hochgezogener und verbreiteter Fleck erkennbar, der sich mit Anilinphthalat nicht anfärben ließ und im UV-Licht hellblau fluoreszierte. Auf einem Chromatogramm wiederholte sich diese hellblaue Fluoreszenz außerdem in halber Höhe über den Kulturlösungen von *Escherichia coli* und *Serratia marcescens* mit 5% Saponin. Diese nicht identifizierbaren Substanzen traten nur in den Kulturlösungen auf und stammen deshalb nicht aus dem Substrat, d.h. den saponinhaltigen sterilen Nährlösungen.

cc) Atmung von Bakterien auf verschiedenen Zuckern

Es ist möglich, daß die bei einer Saponinhydrolyse durch Bakterienenzyme abgespaltenen Zucker unmittelbar durch die Bakterienzelle weiterverarbeitet werden.

Für die folgenden Versuche wurden Bakterien auf 1%igen Lösungen der im Saponin vertretenen Zucker bzw. auf

0,2%igen Lösungen in Kombination mit 1% Glukose in der Warburg-Apparatur überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Verwertung verschiedener im Saponin nachgewiesener Zucker als Kohlenstoffquelle durch *Escherichia coli* und *Serratia marcescens* (5 Stunden Versuchsdauer)

Kohlenstoffquelle:	Escher.c.		Serr.mar.	
	(0)	(5)	(0)	(5)
Sauerstoffverbrauch (%)				
Glukose 1 %	100		100	
Galaktose 0,5%	90	93	69	83
Galaktose 1 %	91	99	79	100
Rhamnose 0,5%	43	22	8	10
Rhamnose 1 %	54	21	11	17
Arabinose 0,5%	69	76	65	61
Arabinose 1 %	80	86	68	69
Glukose 1% und Galaktose 0,2%	100	100	100	100
Glukose 1% und Rhamnose 0,2%	100	100	99	99
Glukose 1% und Arabinose 0,2%	98	100	95	102

Gemessen am Sauerstoffverbrauch werden diese verschiedenen Zuckerkombinationen von den Bakterien in ungefähr demselben Maße genutzt wie Glukose. Ihre Wirkung auf die Atmung bleibt demnach weit hinter der des Saponinpräparates zurück (vergl. Fig. 1 bis 4, S. 16 ff.).

Zur Erklärung der Saponinwirkung reicht die Verwertung der Zucker jedenfalls nicht aus.

dd) Gesamtstickstoffgehalt im Saponin (Merck)

Die Bestimmung des Stickstoffgehaltes im Saponin nach Kjeldahl ergab 0,16% Stickstoff in der Trockensubstanz, ein Hinweis auf das Vorkommen nichtdefinierter stickstoffhaltiger Verbindungen im Saponinpräparat.

Aminosäuren konnten anhand der papierchromatographischen Methode nicht aufgefunden werden.

Laufmittelfront

Figur 10: Papierchromatogramm
zum Nachweis von
Aneurin (Vitamin B₁)

Testsubstanzen:

- (1) Aneurin (1 γ/ml)
- (2) Aneurin (100 γ/ml)
- (3) Aneurin (100 γ/ml)
und Saponin (5%)

Zu prüfende Substanzen:

- (4) Saponinlösung (5%)
- (5) Saponinhydrolysat

Zu prüfende Kulturlösungen:

- (6) von Escherichia coli
ohne Saponin
- (7) von Escherichia coli
mit 5% Saponin

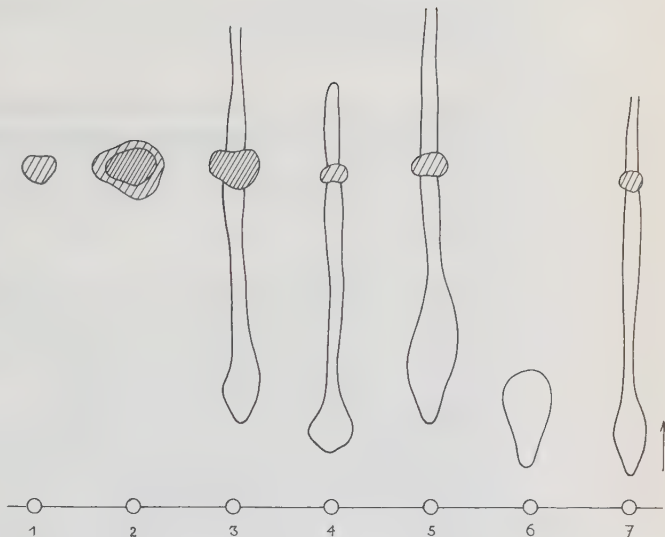
Laufmittel: Isobutanol (30)
Pyridin (20)
Wasser (50)

Entwickler: Kaliumhexacyano-
ferrat (III)
und methanolische
Natronlauge
(Thiochromreaktion)

Fluoreszenz:  blau

 hellblau

 weißlich



ee) Nachweis von Aneurin im Saponin (Merck)

Die Anwesenheit von Aneurin (Vitamin B₁) ließ sich auf papierchromatographischem Wege eindeutig beweisen.

Fig. 10 gibt die Zeichnung eines Chromatogrammes wieder, auf welcher die nur im UV-Licht sichtbaren blauen Fluoreszenzflecken des oxydierten Aneurins (Thiochromreaktion) vermerkt sind.

ff) Atmung von Escherichia coli und Serratia marcescens in aneurinhaltigen synthetischen Nährlösungen

Um den tatsächlichen Einfluß des Aneurins auf die Atmung von Bakterien zu ermitteln, führten wir Atmungsversuche durch:

Bakteriensuspensionen von Escherichia coli und Serratia marcescens in Phosphatpufferlösung wurde Glukoselösung (1%) bzw. Glukoselösung mit Aneurinzusatz ⁺) in steigenden Konzentrationen zugekippt.

SCHOPFER und BLUMER (1938) schätzten auf Grund ihrer Untersuchungen den möglichen Aneurinegehalt des von ihnen verwendeten Saponinpräparates mit 0,012 γ/g Saponin.

In unserer Versuchsreihe verwendeten wir Konzentrationen zwischen $4 \cdot 10^{-11}$ Mol Aneurin/ml Pufferlösung (das entspräche, nach SCHOPFER und BLUMER, einem Saponingehalt von 1%) und $6 \cdot 10^{-4}$ Mol Aneurin/ml Pufferlösung.

Keine der Proben mit Aneurinzusatz zeigte einen gegenüber den Glukoseproben veränderten Sauerstoffverbrauch bei der Atmung.

Setzten wir dagegen in einem weiteren Versuch einem 5%igen Saponinsubstrat (statt 1% Glukose) Aneurin zu, so ließ sich die Atmungsintensität der Bakterien um rund 10% steigern, unabhängig von der Aneurinkonzentration.

⁺) Wir verwendeten das Präparat Thiaminhydrochlorid der Firma Merck-Darmstadt.

Es wurde in steriler Phosphatpufferlösung gelöst, selbst aber nicht mitsterilisiert.

Als Zwischenergebnis läßt sich zusammenfassen:

Die wachstumsfördernde Wirkung des Saponins (Merck) gegenüber Bakterien ist auf das im Präparat enthaltene Gypsophilasaponin oder auf Beimengungen zurückzuführen.

1. Das Gypsophilasaponin als solches eignet sich nicht als Nährstoff: Der Gehalt an Zuckern, die durch enzymatische Hydrolyse eventuell abgespalten werden könnten, reicht zur Erklärung der Förderung nicht aus, das unlösliche Aglykon Sapogenin ist unwirksam. Diese Aussage muß jedoch durch die Überlegung eingeschränkt werden, daß aus der Wirkung der einzelnen Komponenten nicht bindend auf die Wirkung der Gesamtsubstanz geschlossen werden kann.
2. Als weitere Ursache käme eine Beimengung des Präparates mit Nährstoffeigenschaft in Frage. Zwar ist Aneurin im Präparat nachweisbar, es kann aber nicht für die Zellvermehrung bzw. den Atmungsanstieg bei den untersuchten Bakterien allein verantwortlich gemacht werden, wie dies für die von BLUMER und SCHOPFER (1938) an Pilzen beobachtete Wachstumsförderung zutrifft.
3. Möglicherweise stellt sich primär eine Wechselbeziehung auf Grund des besonderen physikalisch-chemischen Zustandes der Bakterienzelle bzw. deren Plasmagrenzschicht zwischen dieser und dem Saponin her, wodurch erst sekundär ein erhöhter Zellstoffwechsel ausgelöst würde.

b) Membranpermeabilität und Saponin (Merck)

In vielen Fällen ist die Ursache für die physiologische Wirksamkeit der Saponine in einer Veränderung der Permeabilität biologischer membranen zu suchen. Die oberflächenaktiven Eigenschaften des Saponins und seine Affinität gegenüber Lipoiden, Cholesterin usw., werden für diesen Membraneffekt verantwortlich gemacht (SCHULMAN, 1937). Demnach

müßten die von uns an Bakterien beobachteten Vorgänge in saponinhaltigen Medien mit einer Erhöhung der Permeabilität der Grenzschicht in Zusammenhang stehen. Diese Überlegungen waren für unsere weiteren Versuche richtungsweisend.

aa) Einwirkung von Tween 80, einer synthetischen oberflächenaktiven Substanz, auf die Bakterienatmung

Tween 80 ist eine synthetisch hergestellte oberflächenaktive Substanz der Firma Atlas Powder Comp. von definierter chemischer Struktur (engl. als "polyoxyethylene-sorbitanmonooleate" bezeichnet). Seine Wirkung auf Bakterien wird unterschiedlich bewertet (vergl. S.58).

Wir verwendeten diese oberflächenaktive Substanz als Ersatz für Saponin.

Wie bei den vorhergehenden Versuchen wurden Bakterien (*Escherichia coli* bzw. *Serratia marcescens*) für die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs bei der Atmung in m/15 Phosphatpufferlösung und 0,5% Glukose suspendiert. Anstelle des bisher verwendeten Saponins kippten wir zu Versuchsbeginn Tween 80 in unterschiedlichen Konzentrationen den Bakterien zu. Die Extinktionsmessungen der Suspensionen zeigten nach 4 Stunden Versuchsdauer von der Tween-Konzentration unabhängige, gleichbleibende Werte, desgleichen die Ablesung des Sauerstoffverbrauchs. Erst eine 25%ige (!) Gabe von Tween 80 rief bei *Escherichia coli* einen 17%igen Atmungsabfall hervor. Die Wirkung von Tween 80 ist nach unseren Ergebnissen mit der Saponinwirkung nicht zu vergleichen.

bb) Verhalten auf Saponin (Merck) kultivierter Bakterien gegenüber Hemmstoffen

Der Überlegung folgend, daß eine Permeabilitätserhöhung der Bakterienmembran durch Saponin auch die bakteriostatische Wirkung von gewissen Hemmstoffen verstärken könnte, führten wir die nachstehend beschriebenen Testversuche mit Antibioticis durch.

Genovisnähragar mit unterschiedlichem Saponingehalt (0 bis 5%) wurde in Petrischalen ausgegossen und nach dem Erkalten mit je 3 ml Bakteriensuspension (in physiologischer Kochsalzlösung) beimpft. Die Schalen wurden in den Brutschrank gestellt. Nachdem die Flüssigkeit in den Schalen eingetrocknet war, wurden unter Wahrung der Sterilität in jede Petrischale je 6 verschiedene Testplättchen (Ø ca. 5 mm) einer Antibiotikatestreihe⁺⁾ aufgesetzt und die Schalen erneut in den Brutschrank gebracht. Die Testreihe setzt sich zusammen aus:

	absolute Trängungsdosis	
Penicillin	2 I.E.	pro Plättchen
Streptomycin	15 γ	"
Tetracyclin	25 γ	"
Chloramphenicol=Chloromycetin	20 γ	"
Oxytetracyclin=Terramycin	25 γ	"
Erythromycin	8 γ	"

Unterstützt das Saponin die Intrabilität der Hemmstoffe ins Innere der Bakterienzelle, so war zu erwarten, daß die Größe der Hemmhöfe am Rande der Testplättchen eine Abhängigkeit von der Saponinkonzentration im Nährboden zeigen würde. Durch Übergießen der Kulturschalen mit verdünnter Salzsäure trat der Kontrast zwischen bewachsenen und nichtbewachsenen Zonen stärker hervor. Die beobachteten Unterschiede im Verhalten ohne und mit Saponin waren jedoch äußerst gering. Lediglich bei Bacillus subtilis war die Bildung eines Hemmhofes um die Tetracyclin-, Chloramphenicol- und Oxytetracyclinplättchen in Gegenwart von 5% Saponin ausgeprägter. Escherichia coli zeigte eine mit steigender Saponinkonzentration sich verstärkende Hemmung bei Chloramphenicol.

Gensauere Resultate sollten Atmungsversuche in Gegenwart von Saponin und einem Atmungsgift ergeben. Zu diesem Zweck wurde Natriumazid erprobt.

In Vorversuchen wurde aus einer Konzentrationsreihe

⁺⁾ Der Firma Heinrich M a c k Nachf., Mikrobiologisches Laboratorium in Illertissen/Bayern, sind wir für die kostenlose Bereitstellung der benötigten Testbestecke und für die Angabe der absoluten Trängungsdosen zu Dank verpflichtet.

($5 \cdot 10^{-4}$ bis $5 \cdot 10^{-2}$ molar) eine Hemmstoffkonzentration von $5 \cdot 10^{-3}$ molar ausgewählt, bei der normalerweise noch keine hemmende Wirkung in Erscheinung tritt.

In Phosphatpufferlösung (pH 6,5) suspendierte Bakterien wurden mit dem gleichen Volumen der doppelt konzentrierten Hemmstofflösung (in Phosphatpuffer), in der zusätzlich 0,5% Glukose gelöst waren, versetzt. Von je 2 Proben enthielt eine zusätzlich eine Einwaage von 5% Saponin.

In Gegenwart von Saponin (5%) wirkte Natriumazid hemmend auf die Bakterienatmung (Tab.4), besonders bei *Serratia marcescens*.

Tabelle 4: Beeinflussung der Bakterienatmung durch Natriumazid in Gegenwart von Saponin (Der Sauerstoffverbrauch wird in % der unvergifteten Probe gemessen)

Bakterienstamm:	% Sauerstoffverbrauch auf m/15 Phosphatpufferlösung (pH 6,5) zusätzlich:			
	0,5% Glu. -	0,5% Glu. NaN ₃ ^{o)} -	0,5% Glu. - 5 % Sap.	0,5% Glu. NaN ₃ ^{o)} 5 % Sap.
Escherichia c. (0)	100	100	100	80
Escherichia c. (5)	100	100	100	81
Serratia m. (0)	100	100	100	48
Serratia m. (5)	100	100	100	42

o) $5 \cdot 10^{-3}$ molare Lösung

cc) Abgabe freier Aminosäuren an das Kulturmedium unter dem Einfluß von Saponin (Merck)

Eine begünstigte Diffusion von Inhaltsstoffen bzw.

Figur 11: Papierchromato-
graphischer Nach-
weis von Leucin
in Kulturlösungen
von *Escherichia*
coli ohne und mit
Saponin

Testsubstanz:

(1) Leucin

zu prüfende Lösungen:

(2) Saponinlösung (5%)

(3) Kulturlösung von
Escherichia coli
ohne Saponin

(4) Kulturlösung von
Escherichia coli
mit 5% Saponin

Laufmittel: α -Picolin (70)
Wasser (28)
Ammonium-
hydroxid (2)

Entwickler: Ninhydrin

Farbe: violett



Stoffwechselprodukten aus dem Zellinnern in das umgebende Nährmedium könnte ebenfalls einen Hinweis auf die permeabilitätsverändernde Wirkung des Saponins geben. Aus diesem Grunde wurde die Abscheidung der Aminosäure *L e u c i n* in das Kulturmedium von *Escherichia coli* papierchromatographisch untersucht⁺).

3 Tage alte Bakterienkulturen in saponinfreien und saponinhaltigen (5%) Nährlösungen wurden zentrifugiert, die Bakterienmasse verworfen und die Kulturlösungen zur Verwendung für die Papierchromatographie weiterverarbeitet. Nach dem Entwickeln der Chromatogramme mit Ninhydrin wiesen die in der Höhe der Testsubstanz Leucin erscheinenden Flecken von verschiedenen Kulturmedien deutliche Größenunterschiede auf: Die Leucinflecken der Saponinnährlösungen nahmen eine 3- bis 5-fache Fläche ein gegenüber Leucinflecken der saponinfreien Nährmedien (Fig.11).

Die gesteigerte Exosmose der Aminosäure ins Kulturmedium in Gegenwart von Saponin kann als Folge einer größeren Durchlässigkeit der Bakterienmembran angesehen werden. Eine andere Erklärung wäre die vermehrte Bildung und damit Abscheidung von Leucin infolge des durch Saponin erhöhten Stoffwechsels, wie die Atmungsversuche bereits bewiesen haben.

Die Hinweise auf eine die Permeabilität der Bakterienmembran verändernde Wirkung des Saponinpräparates konnten durch einen weiteren Effekt, die Diffusion von Bakterienfarbstoffen in Gegenwart von Saponin (vergl. Kapitel II), gestützt werden.

⁺) Leucin hat unter den überprüften Aminosäuren den höchsten Rf-Wert, seine Flecken lagen isoliert an der Front der Trennungszonen, es eignete sich deshalb besonders für den Vergleich. An den Aminosäuren Valin, Alanin, Asparaginsäure, Glyzin und Glutaminsäure konnten infolge der ungenügenden Trennung beim eindimensionalen Chromatogramm keine guten Größenvergleiche angestellt werden.

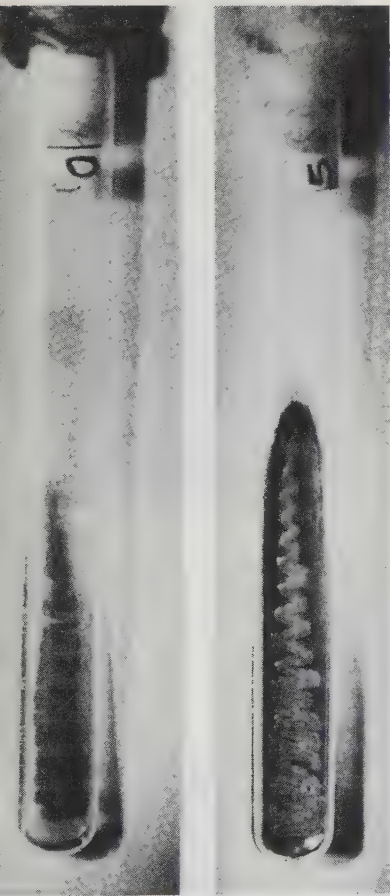


Abb.1:

Schrägagarkulturen von *Serratia marcescens* mit 0% Saponin (links) und 5% Saponin (rechts) (im Auflicht fotografiert)

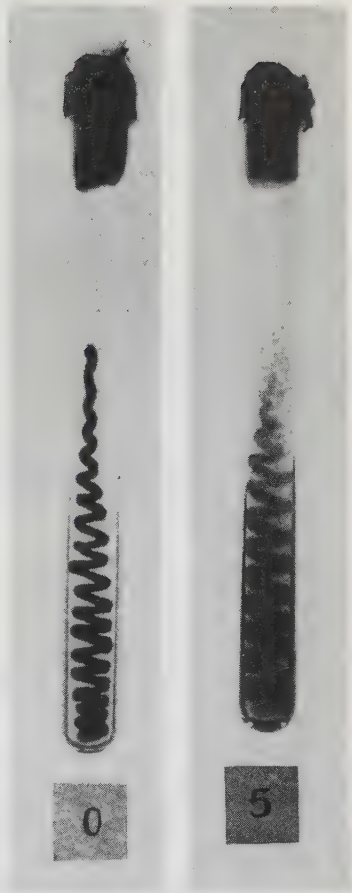


Abb.2:

Schrägagarkulturen von *Serratia marcescens* mit 0% Saponin (links) und 5% Saponin (rechts) (im durchfallenden Licht fotografiert)

Kulturen ohne Saponin: Der Agar ist farblos, der Bakterienausstrich normal gefärbt.

Kulturen mit 5% Saponin: Der Farbstoff diffundiert in den Nähragar, der Bakterienausstrich wirkt "zerfließend", ist farblos und feuchtglänzend.

II.

Saponin (Merck) und Bakterienfarbstoffe

Bei Vorversuchen, zu denen auch farbstoffbildende Bakterien herangezogen wurden, fiel an einigen Stämmen eine Farbstoffdiffusion in das saponinhaltige Nährmedium auf.

Nachdem BOAS (1928) bereits eine Exosmose von Anthozyan und Gerbstoff aus den Zellen höherer Pflanzen unter Saponineinfluß festgestellt und zur Deutung dieses Vorganges eine Permeabilitätssteigerung angenommen hatte, sollte die entsprechende Erscheinung bei Bakterien genauer verfolgt werden.

1. Diffusion verschiedener Bakterienfarbstoffe in saponinhaltige Nährmedien

Die farbstoffabscheidenden Kolonien waren durch ein vermehrtes Wachstum ausgezeichnet und von einem Farbstoffhof umgeben, der sich mit steigender Saponinkonzentration verstärkte. Die Bakterienkolonien verloren in gleichem Maße an Pigment: Auf 1% Saponin waren sie am Rand, auf 5% Saponin fast vollständig entfärbt. Zudem wiesen sie, wie bereits erwähnt, eine weißliche feuchtglänzende Oberfläche auf (Abb. 1 und 2). ⁺⁾

Diese Erscheinung ließ sich an *Pseudomonas pyocyanea* (blaugrün), *Chromobacterium violaceum* (blau, Abb.3) und vor allem an *Serratia marcescens* (orangerot, Abb.3) feststellen. Andere Farbstoffbildner, wie z.B. *Micrococcus aurantiacus* (orange), *Sarcina rosea* (rosa) oder *Sarcina flava* (gelb) zeigten dagegen außer der Kolonievergrößerung die eben erwähnte Veränderung nicht. Die Farbstoffe von *Pseudomonas pyocyanea*, Fluorescein und Pyocyanin, sind wasserlöslich. Das wasser-

⁺⁾ Auf synthetischen Nährböden, die selbst nur eine schmutzigweiße Eigenfarbe besitzen, war die Farbstoffabgabe an das Medium unter Saponineinfluß gut erkennbar.

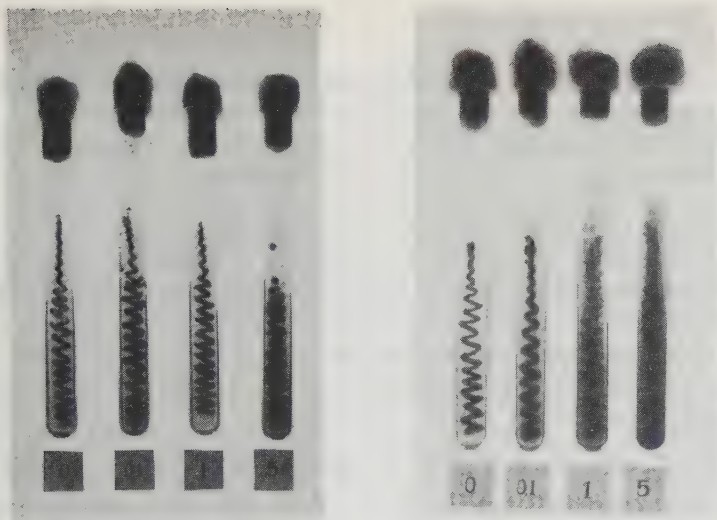


Abb. 3: Diffusion von Bakterienfarbstoffen in saponin-
haltige Nährböden:
links: Schrägagarkulturen von *Chromobacterium*
violaceum (0 - 0,1 - 1 bzw. 5% Saponin
im Nährboden)
rechts: Schrägagarkulturen von *Serratia marcescens*
(0 - 0,1 - 1 bzw. 5% Saponin im Nährboden)

unlösliche⁺) Prodigiosin von *Serratia marcescens* kann bei starker Pigmentierung der Bakterien in amorphen Körperchen nach außen abgeschieden werden (RIPPEL-BALDES, S. 38, 1955; BERGEY'S MANUAL, S. 479 ff., 1948). Ähnliches dürfte für den wasserunlöslichen Farbstoff Violacein von *Chromobacterium violaceum* gelten⁺⁺).

⁺) In der Literatur werden neuerdings des öfteren wasserlösliche rote Serratiapigmente erwähnt, so z.B. bei WILLIAMS, R.P., TAYLOR, W.W., HAWKINS, D.jr. und I.L. ROTH: A Water-soluble Diffusible Pigment Produced by a Strain of *Serratia marcescens* (*Chromobacterium prodigiosum*), *Nature* 182, S. 1028-1029, 1958 oder bei HATTORI, S., YOSHIDA, S. und I. NOGUCHI: Prodigiosin-Kohlenhydrat-Eiweiß-Komplex, ein extrazelluläres Chromoprotein von *Serratia marcescens*, *Naturwissenschaften* 48, S. 305, 1961.
Das von uns extrahierte Serratiapigment ist ebenfalls etwas wasserlöslich.

⁺⁺) SCHMIDT, J. und F. WEIS: *Die Bakterien*, Jena, S. 206, 1902

Die wasserunlöslichen Farbstoffe der beiden eingangs erwähnten *Sarcina*-Stämme und der *Micrococcus*-Stämme (zum großen Teil lipoidlösliche Karotinoide) diffundierten dagegen nicht in die Saponinmedien.

Zunächst war zu klären, ob die Diffusion nur auf einem festen Nährboden möglich ist oder auch in einem flüssigen Nährmedium. *Serratia marcescens* wächst in synthetischen Nährlösungen nur sehr schlecht an, die beste Ausbeute wurde mit der synthetischen Asparagin-Glyzerin-Nährlösung (s.S.6) gewonnen, die außerdem als farblose Flüssigkeit für die folgenden Versuche sehr geeignet war.

In je 20 ml Nährlösung (in 50 ml Erlenmeyerkölbchen) wurden 0 - 0,1 bzw. 1% Saponin gelöst und diese Lösungen sterilisiert. Nach der Einsaat von farbstoffbildenden Bakterien wurden die Kölbchen im Brutraum bei 23° C auf die Schüttelmaschine gestellt. Da Wachstum und Farbstoffbildung der Bakterien in flüssigem Medium verzögert sind, konnten die Kulturen erst im Alter von 5 bis 8 Tagen, nämlich sobald eine deutliche Farbstoffbildung erkennbar war, weiterverarbeitet werden. Die Suspensionen wurden zentrifugiert, der Rückstand auf der Zentrifuge mehrmals gewaschen und das Trockengewicht bestimmt. Dabei bestätigte sich die in Kapitel I erläuterte Zunahme des Bakterienwachstums auf Saponinnährböden.

Tabelle 5: Farbe des Bakterienrückstandes (1 Woche Kulturdauer)

Bakterien:	ohne Saponin:	mit Saponin:
Luftkokken, rosa	orange	orange
<i>Sarcina flava</i>	weißlich	weißlich
<i>Micrococcus luteus</i>	gelb	gelb
<i>Pseudomonas pyocyanea</i>	weißlich	weißlich
<i>Serratia marcescens</i>	rot	weißlich
<i>Chromobact. violaceum</i>	schwach violett	weißlich

Die überstehende Flüssigkeit zeigte die in Tabelle 6 angegebene Beschaffenheit.

Tabelle 6: Farbe und Fluoreszenz der Kulturflüssigkeiten
(1 Woche Kulturdauer)

Zentrifugat von:	% Saponin	pH ^{o)}	Farbe	Fluoreszenz
Nährlösung (allein)	0 0,1 1	6,5 " "	farblos gelblich gelblich	farblos gelblich gelblich
Luftkokken, rosa	0 0,1 1	" " "	farblos gelblich gelblich	hellblau fahlblau fahlblau
Sarcina flava	0 0,1 1	" " "	farblos gelblich gelblich	hellblau fahlblau fahlblau
Micrococcus luteus	0 0,1 1	" " "	farblos gelb gelb	milchig blau milchig grünlich milchig grün
Chromobact. violaceum	0 0,1 1	" " "	weingelb weingelb gelb	hell blaugrün hell blaugrün blaugrün
Pseudomonas pyocyanea	0 0,1 1	" " "	gelbgrün blaugrün blaugrün	milchig blau milchig blau milchig blau
Serratia mar- cescens	0 0,1 1	" " "	rosa(schwach) rosa rosa	lavendelblau lavendelblau lavendelblau

o) Die pH-Messungen wurden mit Lyphan-
papier durchgeführt.

Die gelbliche Färbung bei den beiden ersten Stämmen (rosa
Luftkokken und Sarcina flava) ist, wie der Farbvergleich
ergibt, auf die Eigenfarbe des Saponins zurückzuführen.
Der Einfluß des Saponins ist auf flüssigem Medium geringer
als auf festem Medium. Zur Anregung einer größeren Farbstoff-
diffusion wurden deshalb für die weiteren Untersuchungen an
Serratia marcescens feste Nährböden verwendet.

2. Farbe des Serratia-pigmentes ("Prodigiosin") und Saponingabe

Die durch Saponingabe gesteigerte Farbstoffdiffusion bei *Serratia marcescens* ist begleitet von einer zweiten Erscheinung: Bakterien auf 0% Saponin sind o r a n g e r o t gefärbt, auf 0,1% Saponin r o t , Bakterien auf 1 bzw. 5% Saponin dagegen schwach p u r p u r r o t (Der entsprechende Agar zeigt in den beiden letzteren Fällen intensive Färbung!). Der unterschiedliche Farbton wird durch den Saponingehalt induziert: Überimpfte man eine purpurrote Kolonie von 5% Saponinnähragar auf saponinfreien Agar, so entwickelten sich Kolonien in der Normalform mit orangerotem Pigment, selbst wenn sie vorher in mehreren Passagen auf 5% Saponin kultiviert worden waren.

Eine Farbänderung und ein Nachdunkeln der Farbe entsteht häufig auch bei Alterung der Bakterien und bei pH-Änderungen (orangerot im alkalischen, purpurrot im saueren Bereich).

WEISS (1949) konnte keine Beziehung zwischen dem durch das Alter und dem durch den Reaktionszustand bedingten Farbumschlag finden: Der pH-Wert verschiebt sich mit zunehmendem Alter nach der alkalischen Seite.

Zur Überprüfung einer eventuellen pH-Abhängigkeit der Farbänderung unter Saponineinfluß wurde *Serratia marcescens* in Petrischalen auf Nähragar mit unterschiedlichem Saponingehalt herangezogen. Nach 4 Tagen wurden die deutlich pigmentierten Bakterien vom Nährboden abgehoben und der pH-Wert der in aqua dest. suspendierten Bakterien bzw. der Agaroberfläche mit einem Mikro-pH-Meter von Pusl bestimmt (Tab.7).

Tabelle 7: pH-Wert der auf Saponin gezogenen Bakterien und der betreffenden Substrate

Sap.-Gehalt des Agars %	Farbe	Agar- oberfl. pH	tieferer Schicht ^{o)} pH	Bakt.- oberfl. pH
0	orange	8,4	8,4	7,0
0,1	rot	8,5	8,0	7,0
1	purpur	8,4	8,1	7,2
5	purpur	8,6	8,0	7,2

^{o)} Eine 3 mm dicke obere Schicht wurde entfernt.

Wurden saponinfrei gezüchtete Bakterien in einer m/15 Phosphatpufferreihe suspendiert und nach 20 Min. zentrifugiert, dann zeigten die Zentrifugenrückstände folgende Farben:

pH:	3,6	4,7	5,5	6,5	7,0	7,4	8,0	9,8
Farbe:							orangerot	

Eine direkte Beziehung zwischen Saponingehalt und pH ist demnach nicht abzuleiten, es sei allerdings darauf hingewiesen, daß die tatsächlichen pH-Verhältnisse im Innern der Bakterien nicht erfaßt werden können.

3. Abhängigkeit der diffundierten Farbstoffmenge vom Saponin- gehalt des Nährbodens

Es sollte nun versucht werden, den Farbstoff möglichst vollständig aus den Bakterien bzw. den Nährböden zu extrahieren, um zu einer Abschätzung der diffundierten Mengen zu gelangen. Da bei Kulturen von *Serratia marcescens* die Farbstoffdiffusion am deutlichsten und mit Sicherheit reproduzierbar war, wurde dieses Bakterium zu den Extraktionsversuchen herangezogen.

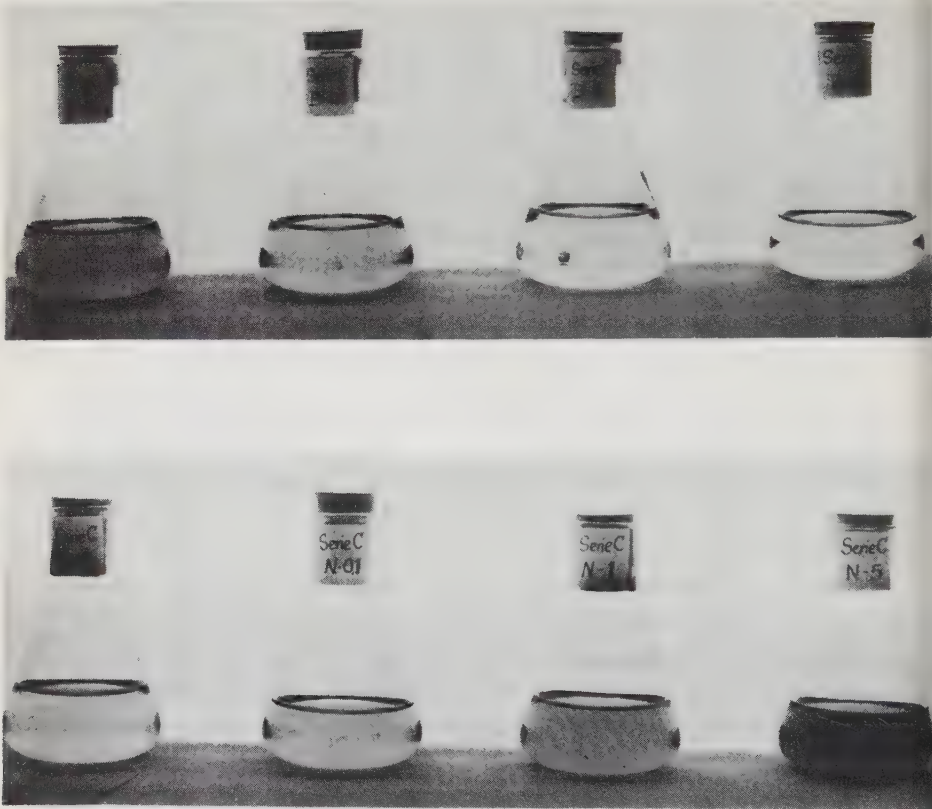


Abb.4: Farbstoffextrakte von *Serratia-marcescens*-Kulturen

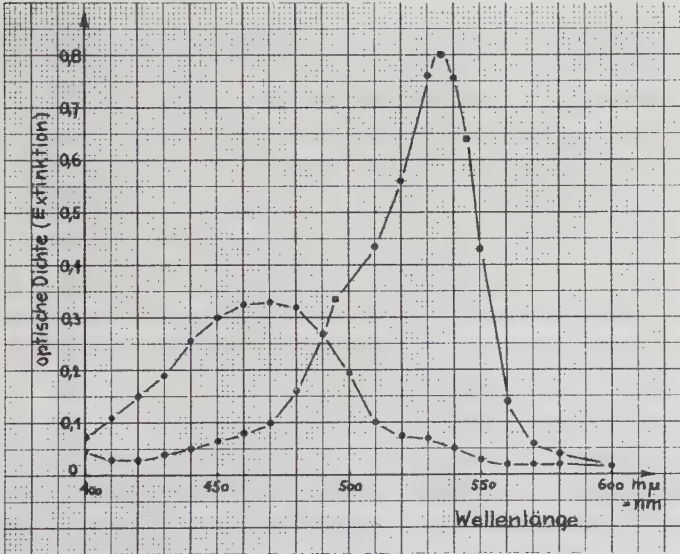
Obere Reihe: Bakterienextrakte (Die Bakterien wurden auf synthetischen Nährböden mit 0 - 0,1 - 1 bzw. 5% Saponin gezüchtet.)

Untere Reihe: Extrakte der zur Anzucht der Bakterien verwendeten synthetischen Nährböden (0 - 0,1 - 1 bzw. 5% Saponingehalt)

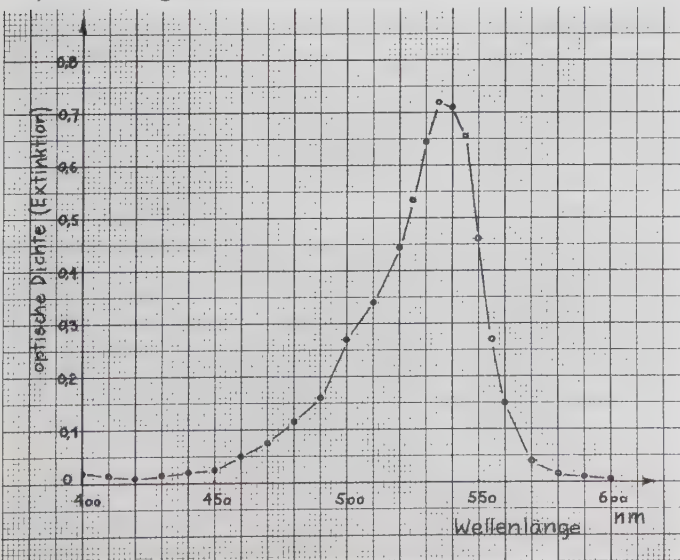
Figur 12: Absorptionsspektren von "Prodigiosin", dem roten Farbstoff von *Serratia marcescens*

(-.-.-.-.- in saurem Äthanol
-.-.-.-.- in alkalischem Äthanol)

a) nach HUBBARD und RIMINGTON, S. 222, 1950



b) nach eigenen Untersuchungen



Der "Farbstoff" von *Serratia marcescens* ist nach neueren Ergebnissen ein Gemisch aus wenigstens vier Farbstoffen mit ähnlichen spektralen Eigenschaften (WILLIAMS, GREEN und RAPOPORT, 1956), unter denen das rote Prodigiosin, ein Pyrrolfarbstoff mit der wahrscheinlichen Summenformel $C_{20}H_{25}N_3O$ überwiegt (TREIBS und ZIMMER-GALLER, 1960) ⁺).

Die Extraktion des Pigmentgemisches erfolgte nach dem Verfahren von WREDE und HETTICHE (1929). ⁺⁺) (Vergl. S.11)

Die auf diese Weise gewonnenen rohen Farbstoffextrakte sollten nach der Vorschrift zur weiteren Reinigung mit Chloroform ausgeschüttelt werden. Da die Farbstoffe der von uns verwendeten Bakterienkulturen in Chloroform nicht löslich sind, unterblieb die Verarbeitung der Rohextrakte.

In Abb.4 sind die Farbstoffextrakte der Bakterien bzw. der jeweils entsprechenden Nährböden abgebildet. Die unterschiedliche Farbintensität der essigsauren, methanolischen Lösungen ist deutlich sichtbar.

HUBBARD und RIMINGTON (1950) geben in ihrer Arbeit das Absorptionsspektrum des Prodigiosinfarbstoffes an. Zum Vergleich folgt eine Extinktionskurve des von uns isolierten Farbstoffes (Rohextrakt) in saurem Medium (Fig.12). Aus der Gegenüberstellung der beiden Spektren ist ersichtlich, daß eine weitere Reinigung der Rohextrakte (siehe oben) nicht nötig war.

Die Ergebnisse der Extraktionsversuche sind in Tabelle 8 zusammengefaßt. Die beim Absorptionsmaximum des Prodigiosins (535 nm) ermittelten Extinktionswerte repräsentieren den Farbstoffgehalt der verschiedenen Extrakte.

⁺) Die Synthese des Prodigiosins ist neuerdings den Forschern RAPOPORT und HOLDEN (1962) gelungen.

⁺⁺) In den Bakterienmassen der stark pigmentierten Kulturen (0 und 0,1% Saponin) blieben geringe Farbstoffreste zurück, die sich nicht extrahieren ließen. (Vergleiche dazu TREIBS und ZIMMER-GALLER, 1960).

Tabelle 8: Vergleich der aus den Bakterienmassen bzw. aus den Nährböden extrahierten Mengen des Farbstoffes von *Serratia marcescens*

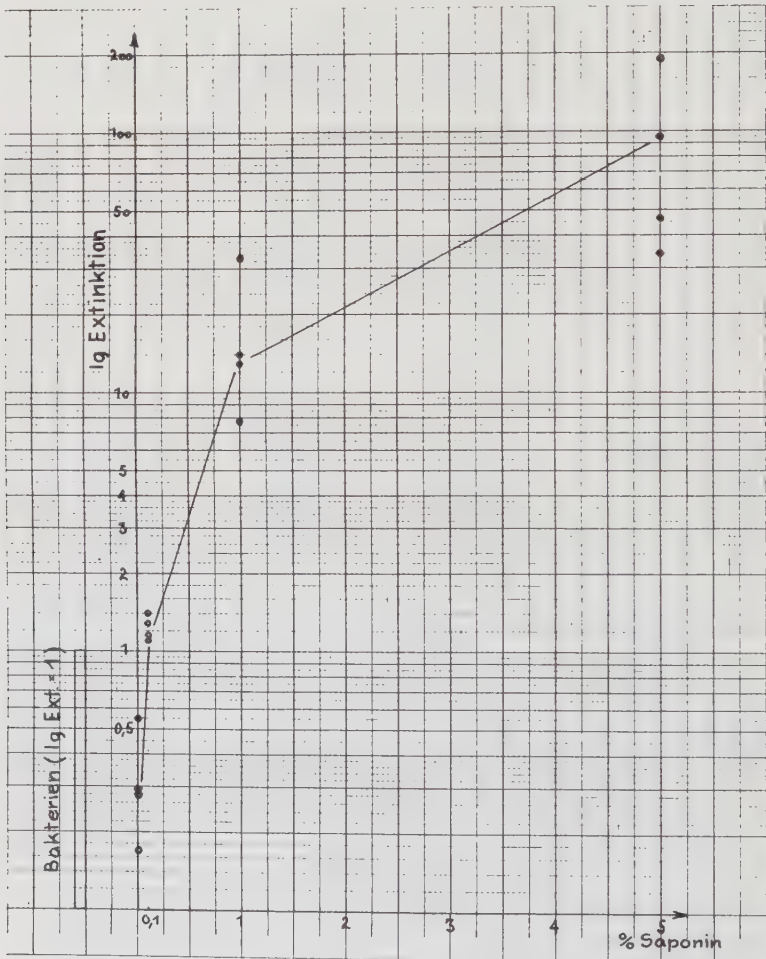
a	b	c	d	e
Saponin- gehalt %	Alter Tage	Bakterien Extinktion bei 535 nm	Nährboden(20g) Extinktion bei 535 nm	Extinktion Bakt.:Nährb.
0	8	0,31	0,0875	1 : 0,28
0	8	0,225	0,1225	1 : 0,55
0	10	1,0	0,165	1 : 0,17
0	11	0,91	0,263	1 : 0,29
0,1	8	0,177	0,205	1 : 1,13
0,1	8	0,22	0,285	1 : 1,3
0,1	8	0,5	0,555	1 : 1,11
0,1	10	0,42	0,602	1 : 1,43
1	6	0,085	0,661	1 : 7,78
1	6	0,045	0,58	1 : 12,9
1	8	0,0375	0,5275	1 : 14,0
1	8	0,0175	0,585	1 : 33,4
5	8	0,0075(?)	1,44	1 : 192,0
5	8	0,04	1,85	1 : 46,2
5	8	0,035	1,1925	1 : 34,1
5	8	0,01 (?)	0,96	1 : 96

(?) Bei höheren Saponinkonzentrationen enthalten die Bakterienextrakte nurmehr so wenig Farbstoff, daß der Meßfehler bei der Extinktion die Fehlergrenze weit überschreitet.

Um die Menge des in den lebenden Bakterien verbliebenen Farbstoffes mit der in die Saponinnährböden diffundierten Farbstoffmenge besser vergleichen zu können, berechneten wir aus den betreffenden Extinktionswerten der Farbstoffextrakte die in Spalte e der Tabelle 8 wiedergegebenen Verhältniszahlen: Die Extinktionswerte der Bakterienextrakte wurden jeweils gleich 1 gesetzt. Die Extinktionswerte der Nährbodenextrakte variieren entsprechend dem Saponingehalt.

In Fig.13 ist dieser Vergleich graphisch dargestellt.

Figur 13: Vergleich der aus Bakterien bzw. den entsprechenden Nährböden extrahierten Farbstoffmengen in Abhängigkeit vom Saponingehalt des Nährmediums.
(Verg. Spalte e der Tabelle 8)



Zumindest bei niederen Saponinkonzentrationen scheint die Farbstoffabgabe an das Medium dem Saponingehalt des Nährbodens proportional zu sein.

4. Vergleichende Untersuchungen über die Abgabe von
Bakterienfarbstoff in oberflächenaktiven Lösungen
bei unterschiedlichem pH-Wert

Daß die Farbstoffdiffusion nicht allein auf eine Überproduktion an Farbstoff infolge vermehrten Wachstums (unter Saponineinfluß) zurückzuführen ist, die Permeation vielmehr durch das Saponin im Außenmedium hervorgerufen wird, beweist die fast vollständige Entfärbung der Bakterien. Bei den folgenden Diffusionsversuchen ließen wir neben Saponin wasserlösliche, synthetische oberflächenaktive Stoffe auf *Serratia marcescens* einwirken. Die Zeitdauer des Kontaktes zwischen Bakterienmasse und oberflächenaktivem Agens wurde so gewählt, daß eine meßbare Farbstoffdiffusion zu erkennen war, eventuelle stärkere Schädigungen der Bakterien oder eine Nährstoffwirkung des Detergens jedoch weitgehend vermieden wurden.

Als Testsubstanzen wurden verwendet: ⁺)

Kationaktive Stoffe:

Repellat W.Z. (Laurylpyridiniumsulfat) Böhme Fettchemie
Sapamin CH W.Z. (Aminsalz) Firma Ciba

Anionaktive Stoffe:

Nekal W.Z. (Alkyl-naphthalinsulfonat) I.G. Farben
Kaliseife
Saponin (Merck)

Normale, 3 Tage alte *Serratia*-Plattenkulturen wurden abgeerntet, die Bakterienmasse mit physiologischer Kochsalzlösung mehrmals (bis die Waschflüssigkeit farblos war) auf der Zentrifuge gewaschen und dann in 4 verschiedenen m/15 Phosphatpufferlösungen (pH: 4,5 - 5,6 - 7,8 - 8,9) suspendiert. Je 2 ml dieser Suspensionen wurden in Zentrifugengläschen, die

⁺) KLING, Walter: Wasserlösliche grenzflächenaktive Stoffe, Angewandte Chemie 65, S. 201-212, 1953

bereits je 20 mg = 1% der vorgesehenen oberflächenaktiven Substanzen als Einwaage enthielten, pipettiert. Nach 10 Min. wurde erneut zentrifugiert und anschließend die Extinktion der überstehenden Lösung gegen eine Vergleichsprobe (m/15 Phosphatpufferlösung und Substanzeinwaage) mit dem entsprechenden Filter im Lange-Kolorimeter gemessen. Die unterschiedliche Färbung der auf diese Weise behandelten Bakterien gibt Tabelle 9 wieder.

Tabelle 9: Diffusionsversuche mit oberflächenaktiven Substanzen: Farbe des Bakterienrückstandes bei unterschiedlichem pH.

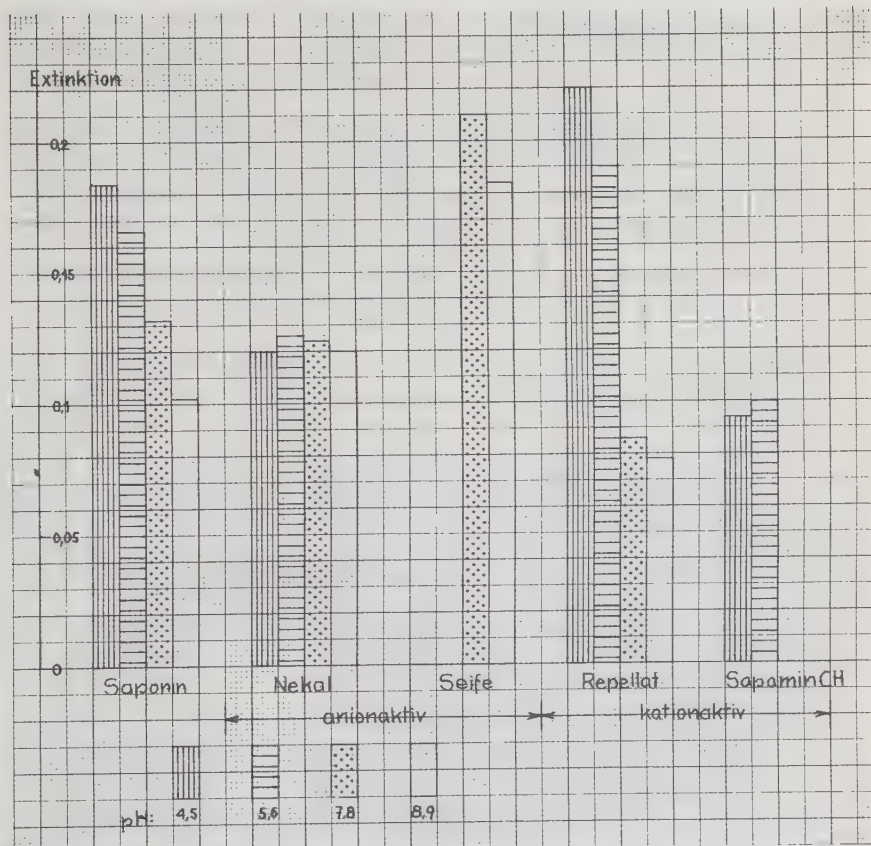
nach Behandlung in:	Farbe des Bakterienrückstandes beim pH-Wert (m/15 Phosphatpuffer)			
	4,5	5,6	7,8	8,9
m/15 Phosphatpufferlsg.	p	p	o	o
Saponin (Merck)	p	p	r	o
Nekal	p	p	p	p
Seife	weißlich trüb		p	p
Repellat	p	p	o	o
Sapamin	p	p	o	o

p = purpurrot; r = rosa; o = orangerot

Im Diagramm der Fig.14 sind die Mengen des diffundierten Farbstoffes (ausgedrückt in Extinktionswerten) und gleichzeitig die pH-Abhängigkeit der Diffusion dargestellt.

In m/15 Phosphatpufferlösung unterbleibt eine weitere Diffusion (nach mehrmaligem Auswaschen der Bakterien!). Alle untersuchten oberflächenaktiven Substanzen rufen dagegen eine erneute Farbstoffabgabe hervor. Die Intensität ist pH-abhängig. Die kationaktiven Stoffe bewirken im sauren Bereich eine stärkere Farbstoffdiffusion (hohe Extinktionswerte), im alkalischen Bereich ist die Diffusion gering (niedrige

Figur 14: Abgabe von Bakterienfarbstoff (Prodigiosin) an die Suspensionsflüssigkeit in Gegenwart verschiedener oberflächenaktiver Substanzen



Extinktionswerte). Bei der anionaktiven Seife verhält es sich umgekehrt. Nekal (anionaktiv) ruft weder einen Farbumschlag in den Bakterien noch eine durch den pH-Wert veränderliche Diffusion hervor. Das Saponinmolekül zeigt eine qualitativ ähnliche Wirkung wie das kationaktive Repellat.

Fig. 14 bringt die grundsätzlichen Unterschiede zum Ausdruck. Eine quantitative Auswertung dieses Vergleichs scheint nicht angebracht, da die Meßergebnisse von Versuch zu Versuch streuten.

D. D i s k u s s i o n

Die Wirkung von Saponin (Saponinum purum album Merck) auf verschiedene Bakterien ist vor allem an zwei Erscheinungen besonders deutlich zu erkennen:

- I. Saponin hat als Bestandteil des Nährmediums auf das Wachstum einiger von uns geprüfter Bakterienstämme stimulierenden Einfluß, es kann sogar in manchen Fällen als alleiniges Substrat ein Bakterienwachstum bewirken.
- II. Verschiedene farbstoffbildende Bakterien scheiden auf saponinhaltigen Nährböden Pigmente nach außen ab.

Da wir bei der Untersuchung dieser beiden Effekte methodisch verschiedene Wege einschlagen mußten, ist die vorliegende Arbeit in zwei Teile gegliedert:

Kapitel I behandelt den "Einfluß von Saponin (Merck) auf Wachstum und Atmung von Bakterien". Als Versuchsobjekte dienten Kulturen von *Escherichia coli* und *Serratia marcescens*. Kapitel II berichtet über "Saponin und Bakterienfarbstoffe". Als Versuchsstamm wählten wir *Serratia marcescens*.

Diese Gliederung zeichnet sich zwangsläufig auch in der folgenden Diskussion der Ergebnisse ab.

Die wachstumsfördernde Wirkung des Saponinpräparates wurde bei steigender Saponinkonzentration (0,1 bis 20%) durch nephelometrische Messungen der Bakteriendichte, bzw. durch manometrische Ermittlung der Bakterienatmung an *Escherichia coli* und *Serratia marcescens* untersucht.

Der Sauerstoffverbrauch von *Escherichia coli* erreicht bei einem Zusatz von 10% Saponin sein Maximum, bei *Serratia marcescens* sogar erst bei noch höheren Saponinkonzentrationen. Durch zusätzliche Gabe von 1% Glukose steigen die Atmungswerte und übertreffen die Atmung auf reiner, 1%iger Glukosenährlösung bis um das Fünffache.

Ähnliche Beobachtungen, eine Zunahme der Suspensionsdichte in Gegenwart von Saponin, machte BLUMER (1937) an *Ustilago violacea* (Pers.) Fuck..

Bei der Deutung der physiologischen Wirksamkeit des Saponins wird häufig eine unmittelbare Beziehung zwischen der Oberflächennaktivität des Saponins und seiner Einwirkung auf biologische Systeme in Betracht gezogen. BOAS (1928) lehnte als Ergebnis eingehender Diskussionen (vergl. KOFLER, 1922, 1929) diese Erklärung ab. Nach HEINE (1953) ist diese Beziehung dagegen für die Erhöhung der Permeabilität pflanzlicher Zellen verantwortlich, nach GERUNDO (1950) für die Wachstumszunahme von *Mycobacterium tuberculosis*.

Verfolgen wir zunächst die Berichte über die Eignung definierter, synthetischer oberflächenaktiver Substanzen als Substrat für Bakterienkulturen. GLASSMAN (1948) referiert in seiner Arbeit frühere Untersuchungen über die Wechselwirkung zwischen Bakterienwachstum und Oberflächenspannung und warnt dabei, Effekte der Entspannung zuzuschreiben, für die eigentlich die entspannenden Stoffe verantwortlich sind. Wichtig ist nach GLASSMAN die ionogene oder nichtionogene Natur der Agenzien: Kationische oberflächenaktive Stoffe hemmen in einem physiologischen pH-Bereich den bakteriellen Stoffwechsel, anionische oberflächenaktive Substanzen bewirken eine Hemmung nur bei Gram-positiven Bakterien. Die Ergebnisse von FISCHER (1958) veranschaulichen, daß die Sauerstoffaufnahme von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien in Glukosebouillon in Gegenwart anionischer grenzflächenaktiver Stoffe (Fettalkoholsulfat und Alkylbenzolsulfat) beeinträchtigt ist. (Eine Totalhemmung tritt bei 1 bis 10 g/l auf.) Die Zahl der wachstumsfähigen Zellen verringert sich. Die Gram-negativen Bakterien sind weniger empfindlich, bei ihnen ist vor allem der Betriebsstoffwechsel betroffen. Die Befunde mit nichtionogenen oberflächenaktiven Stoffen sind unterschiedlich: GLASSMAN berichtete von einer Wachstums-erhöhung bei manchen Tuberkelbazillen durch 0,1% Tween 80. WINTER und WILLECKE (1957) stellten mit mehr als 60 mg/ml Tween 80 nach 24 Std. Kontrolle eine 100%ige Wachstumshemmung bei *Escherichia coli* fest. (Diese starke Wirksamkeit zeigten nur frisch bereitete Emulgator-Bouillon-Mischungen.) ULLMANN (1957) hält die nichtionogenen oberflächenaktiven Agenzien für indifferent gegenüber dem Bakterienwachstum, was durch eigene Atmungsversuche mit Tween 80 an *Escherichia coli* bestätigt wurde.

Somit reicht zur Erklärung der stark erhöhten Bakterienatmung eine Änderung der Oberflächenaktivität des Mediums durch Saponinzusatz nicht aus.

Die Saponinwirkung kann möglicherweise auf eine Veränderung der Zellpermeabilität zurückzuführen sein.

BOAS (1928) erklärt die Permeabilitätsänderung durch eine Reaktion zwischen dem Saponin und den in der Plasmagrenzschicht vorhandenen Lipoiden. (Als Versuchsobjekte dienten ihm vor allem Hefezellen.) Ähnlich beruht die Saponinhämolyse auf einer Reaktion zwischen dem Saponin und dem Cholesterin in der Erythrozytenmembran. Den Mechanismus der Komplexbildung aus verschiedenartigen Saponinen und Cholesterin durch Adsorptionsvorgänge haben SCHULMAN und seine Mitarbeiter (SCHULMAN und RIDEAL, 1937; GODDARD und SCHULMAN, 1953) erläutert. SCHOPFER und BLUMER (1938) lehnen dagegen eine Störung der Membranpermeabilität durch Saponin ab, da sie in vitro eine Komplexbildung mit Sterinen zwar durch das steroidale Digitonin, nicht aber durch Gypsophilasaponin erreichten. Auch BOBB und GROMAN (1957) stellten bei Untersuchungen über die Hemmung der Phagenadsorption fest, daß Saponin (unbekannter Herkunft) unfähig ist, ähnlich dem Digitonin mit phagenrezeptorisch wirkenden Lipoidmaterialien (*Corynebacterium diphtheriae*) zu reagieren.

Eine Beeinflussung der osmotischen Wirksamkeit des Nährmediums gegenüber Bakterien durch Saponin kann als weitere Ursache für eine erleichterte Zellintrabilität angesehen werden. Dafür wären vor allem die Beimengungen im Saponinpräparat verantwortlich zu machen.

HAUSER und LANGER (1950) versuchten den Einfluß arteigener Saponine auf das Wachstum höherer Pflanzen durch adsorptive Kräfte zwischen dem Saponin und den Plasmakolloiden und eine daraus resultierende veränderliche Wasseraufnahme der Zellen abzuleiten. Für die Bakterienzelle dürften ähnliche Vorgänge nicht zutreffen, da es unwahrscheinlich ist, daß das Saponinmolekül eine intakte Zellhülle zu durchdringen vermag.

Bei unseren Versuchen mit dem oberflächenaktiven Saponinpräparat wurden die Sauerstoffaufnahme bei der Atmung und der gleichzeitige Bakterienzuwachs sowohl auf saponinhaltigem (2%) Glukosenährmedium als auch vergleichsweise auf bloßem Glukosenährmedium ermittelt. Für beide Bestimmungsgrößen ergab sich in Gegenwart von Saponin eine Förderung, vorwiegend jedoch für das Bakterienwachstum. Demnach könnte eine Ver-

größerung der Zellkörper auf Grund osmotischer Vorgänge (vergl. MAGER, KUCZYNSKI, SCHATZBERG und AVI-DOR, 1956) oder eine erhöhte Teilungsfähigkeit der Zellen eine Folge des Saponinzusatzes sein. Der mikroskopische Befund spricht gegen eine wesentliche Vergrößerung der Zellen. Das ließe darauf schließen, daß das Saponinpräparat eventuell als Nährstoff verwertet wird.

BARR und LINWOOD (1957) erzielten an gereinigten Kulturen von *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* und *Monilia albicans* mit oberflächenaktiven Substanzen der Gruppen 'Span' und 'Tween' (1 und 5%) ein deutlich erhöhtes Wachstum - das durch Zugabe von Thioglykolat ans Nährmedium noch gesteigert wurde - und wiesen gleichzeitig eine Spaltung der Esterbindung dieser Verbindungen nach. Es ließe sich vermuten, daß Spaltprodukte dieser Oberflächenagzien als Nährstoffe wirken. Die Autoren halten jedoch die direkte Verwertung dieser Stoffe für unwahrscheinlich.

Die Auswertung unserer eigenen Versuche führte zu der Folgerung, daß eine Nährstoffwirkung des aus Pflanzen gewonnenen Saponinpräparates an der gesteigerten Bakterienatmung zumindest beteiligt sein dürfte.

SOLACOLU (1913) erörterte die Frage, ob Pilze sich zu ihrer Ernährung eines Stoffes mit gebundenem Zucker bedienen könnten: Eine hydrolytische Spaltung des Saponins wurde in diesem Falle zwar nicht nachgewiesen, wohl aber ein vermehrtes Mycelwachstum von *Penicillium glaucum* und *Aspergillus niger* auf 1,25% Saponin⁺⁾ . Die Mycelbildung in Saponinlösung fiel allerdings schwächer aus als in Glukoselösung.

Bei unseren Versuchen wurden die gleichen Monosen, die bei der Säurehydrolyse des Saponins freigesetzt werden (Glukose, Galaktose, Rhamnose, Arabinose), in einer Kulturlösung als Substrat kombiniert. Sie verursachten keine Förderung der Sauerstoffaufnahme bei der Bakterienatmung. Das unlösliche

⁺⁾ Die Möglichkeit einer enzymatischen Hydrolyse von verschiedenen Saponinen durch Bakterien zeigt erstmals TWORT (1907) auf. Nach seinen Beobachtungen greift *Escherichia coli* das Saponin jedoch nicht an.

Sapogenin⁺) wurde überhaupt nicht verwertet. Die Annahme einer Steigerung des Stoffwechsels allein durch Ausnützung der durch enzymatische Hydrolyse eventuell verfügbaren Zucker bzw. der Sapogenine läßt sich nicht aufrechterhalten. BLUMER (1937) stellte bei der Besprechung seiner von uns bereits mehrmals zitierten Ustilago-Versuche eine Permeabilitätssteigerung zunächst nicht in Abrede, fand dann aber als Verunreinigung des von ihm verwerteten Saponinpräparates Aneurin und schrieb (SCHOPFER und BLUMER, 1938) nach genauen Untersuchungen diesem Faktor die wachstumsfördernde Wirkung zu. Ebenso wie THREN (1940) wiesen wir im Merck'schen Saponinpräparat Aneurin nach.

Escherichia coli kann Aneurin, wenn es als einzige organische Substanz in einer synthetischen anorganischen Nährlösung geboten wird, abbauen und die Bruchstücke als Zellbaustoff verwerten (WILLIAMS und KOSER, 1947), es kann auch Aneurin aus dem Nährmedium aufnehmen und speichern (HAENEL und SEMRAU, 1959). Die Atmungstätigkeit von Escherichia coli auf einem glukosehaltigen Substrat wird dagegen durch Zugabe von Aneurin nicht beeinflußt, wie unsere Versuche zeigten. Ersetzten wir die Glukose durch Saponin, dann bewirkte das Aneurin eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs bei der Atmung.

Die Wirkung des Saponins auf das Wachstum und die Zellatmung bei Bakterien läßt sich also nicht eindeutig einer der besprochenen möglichen Ursachen zuschreiben.

⁺) GUIRARD, SNELL und WILLIAMS (1946) fanden bei ihren Untersuchungen über die Nährstoffeigenschaft verschiedener Stoffe gegenüber Milchsäurebakterien eine Zunahme des Trockengewichtes durch Saponin ('crude'); mit dem steroiden Saponin Digitonin wurde dagegen nur ein geringer Erfolg erzielt. Sie führten die Aktivität auf das Sapogenin zurück, weil das aktive Material durch Ätherextraktion fast quantitativ aus dem Säurehydrolysat entfernt werden konnte.

Bei der Deutung der Diffusionsversuche und der Farbänderung von *Serratia marcescens* unter Saponineinfluß ergeben sich einige weitere Schwierigkeiten:

Die Farbstoffdiffusion ist in vitro in saurer Saponinpufferlösung am größten, in Lebendversuchen nimmt sie mit steigender Saponinkonzentration zu. Man dürfte demnach annehmen, daß unter Saponineinwirkung die Zelle mehr Säure produziert und dadurch den Farbumschlag und die Farbstoffdiffusion einleitet. Die erhöhte Oberflächenwirkung saurer Saponine in saurem Medium (RUYSEN und WYGAERTS, 1941) könnte - will man eine Permeabilitätsänderung auch auf Grund der Oberflächenaktivität postulieren - als Ursache für die Diffusion anzusehen sein. Für die unterschiedliche Diffusionsstärke im alkalischen Milieu kann allerdings die Oberflächenwirksamkeit des Saponins nicht verantwortlich gemacht werden, da sie - nach den genannten Autoren - im basischen Bereich nur wenig variiert. Gegen diesen Erklärungsversuch sprechen außerdem die von POE und HAWKINS (1952) festgestellte Unterdrückung der Pigmentbildung bei *Serratia marcescens* in saurem Medium und die von uns pH-metrisch ermittelte alkalische Reaktion des Nähragars.

Nachdem TAYLOR und WILLIAMS (1959) bestätigt hatten, daß das *Serratia*-Pigment an Zellteilchen gebunden ist, konnten PURKAYASTHA und WILLIAMS (1960) bei der Aufbereitung von *Serratia marcescens* auf der Zentrifuge Pigmente und Hexosamine in derselben Sedimentfraktion feststellen. Sie schlossen daraus, daß das Pigment mit dem Hexosamin zusammen in der Zellhülle (= Plasmamembran und Zellwand) lokalisiert sein müsse. Demnach bestünde die Wirkung des Saponins eigentlich in einem "Herauslösen" des Pigmentes.

Der Farbänderung dürfte wiederum der Einfluß des Saponins auf den Zellstoffwechsel zugrundeliegen, nämlich eine Variation der das Pigment zusammensetzenden Komponenten. Diese Erklärung wurde bereits auch für die Farbstoffänderung mit

zunehmendem Alter der Kulturen gefunden (MONK, 1957; TREIBS und ZIMMER-GALLER, 1960; WILLIAMS, GOTT und GREEN, 1961).⁺)

Die Diffusion und Farbänderung des roten Serratia-Pigmentes sind wie die Förderung der Sauerstoffaufnahme bei der Bakterienatmung an die unmittelbare Gegenwart von Saponin gebunden. Eine Vorbehandlung mit Saponin erweist sich als wirkungslos.

⁺) Nach längerer Kulturzeit überwiegt der blauviolette Pigmentanteil - von TREIBS und ZIMMER-GALLER *Serratia* genannt -, der sich durch Umwandlung aus dem roten Prodigiosin bildet.

E. Z u s a m m e n f a s s u n g

1. Die Bakterienstämme *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes* und *Serratia marcescens* können eine Saponinlösung (1% Saponinum purum album Merck in aqua bidest.) als alleiniges Substrat verwerten, nicht dagegen *Bacillus subtilis*.

Die Kolonien aller geprüften Bakterienstämme zeigen auf festen, saponinhaltigen synthetischen bzw. Bouillon-Nährböden mit Saponin ein üppiges Wachstum. Sie besitzen eine feuchtglänzende, "zerfließende" Oberfläche.

2. Wesentliche, am mikroskopischen Präparat erkennbare Veränderungen der Bakterienzelle durch Saponin wurden nicht beobachtet.

3. Der Zuwachs von Bakterienkulturen in flüssigen, saponinhaltigen (zwischen 0,1 und 20%) Kulturmedien wurde anhand der Trübungsmessung und der manometrischen Bestimmung der Sauerstoffaufnahme bei der Atmung ermittelt. Der Maximalwert für die Bakteriendichte wird jeweils bei einer niedrigeren Saponinkonzentration erreicht als der für die Atmung.

4. 2% Saponin (in m/15 Phosphatpufferlösung) bewirken bei *Escherichia coli*- und *Serratia marcescens*-Kulturen die gleiche Atmungsintensität wie 1% Glukose (in m/15 Phosphatpufferlösung).

Der in Gegenwart höherer Saponinkonzentrationen (ebenfalls in m/15 Phosphatpufferlösung) gesteigerte Sauerstoffverbrauch beider Stämme kann durch Zugabe von 1% Glukose weiter vermehrt werden.

Auf Saponin-Glukose-Nährmedium (m/15 Phosphatpufferlösung zusätzlich 5% Saponin und 0,5% Glukose) ist die Zunahme des Sauerstoffverbrauchs bei der Atmung im Vergleich zur Zunahme der Bakteriendichte (nach 6 Stunden Versuchsdauer)

geringer als auf Glukose-Nährmedium (m/15 Phosphatpufferlösung zusätzlich 0,5% Glukose).

5. Das unlösliche Hydrolysat (Sapogenin) ist als Substratbestandteil unwirksam gegenüber der Bakterienatmung. Die im löslichen Hydrolysat nachgewiesenen Monosen (Glukose, Galaktose, Rhamnose, Arabinose) fördern die Atmung weniger als die Saponinlösung.
6. Papierchromatographisch läßt sich im Saponin (purum album Merck) eindeutig Aneurin (Vitamin B₁) nachweisen. Reine Aneuringaben, die der sonst zugesetzten Saponinmenge entsprechen, haben keinen dem Saponin vergleichbaren Einfluß auf die Atmung von *Escherichia coli* und *Serratia marcescens*. Somit kann für den Atmungsanstieg der Bakterien der Aneurin Gehalt im Präparat nicht in gleicher Weise verantwortlich gemacht werden, wie für die von anderer Seite festgestellte Zellvermehrung bei Pilzen.
7. Atmungsversuche mit Tween 80, einer nichtionogenen oberflächenaktiven Substanz, zeigen keine Steigerung der Sauerstoffaufnahme, vielmehr eine schwache Hemmung.
8. In Gegenwart von 5% Saponin wirkt Natriumazid in $5 \cdot 10^{-3}$ molarer Konzentration hemmend auf die Bakterienatmung (*Escherichia coli*).
9. Die Abgabe von freiem Leucin an die Kulturlösung unter Saponineinfluß ist papierchromatographisch nachweisbar.
10. Saponin verstärkt die Diffusion von Bakterienfarbstoff bei *Pseudomonas pyocyanea*, *Chromobacterium violaceum* und *Serratia marcescens* in das feste oder flüssige Kulturmedium erheblich. Die Farbstoffe von *Sarcina flava*, *rosa* Luftkokken sowie von *Micrococcus luteus* und *Micrococcus aurantiacus* diffundieren nicht.

11. Kulturen von *Serratia marcescens* zeigen auf saponinhaltigen Nährböden einen Farbumschlag von orangerot nach purpurrot. Auf 5% Saponin sind die Kolonien fast vollständig entfärbt und feuchtglänzend.
12. Das von uns isolierte Rohpigment ist etwas wasserlöslich, löslich in Salzlösungen, Aethanol und Petroläther, nicht löslich in Chloroform und unterscheidet sich dadurch von den meisten in der Literatur beschriebenen Serratia-pigmenten.
13. Bei *Serratia marcescens* besteht eine Proportionalität zwischen dem Saponingehalt des Nährbodens und der Farbstoffdiffusion.
14. Vergleichende Diffusionsversuche mit Saponin und synthetischen oberflächenaktiven Substanzen an *Serratia marcescens* ergeben eine pH-abhängige Farbstoffabgabe (Ausnahme "Nekal"). Saponin bewirkt im sauren Reaktionsbereich die stärkste Diffusion.
15. Der Einfluß von Saponin (Merck) auf Bakterien ist sehr komplexer Natur. Das erhöhte Bakterienwachstum, die Zunahme der Bakterienatmung, die Diffusionserscheinungen und die Farbänderung des Serratia-pigmentes sind wohl zum Teil auf eine gesteigerte Permeationsmöglichkeit durch Einwirkung des Saponins auf die Zellgrenzschichten zurückzuführen, zum Teil aber auch auf die Nährstoffwirkung der im Saponinpräparat enthaltenen Substanzen mit Nährstoffeigenschaften.

F. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- BALANSARD, J et
PELLISSIER, F. Actions des Saponines sur l'Édifica-
tion du Pigment Chlorophyllien.
Comptes Rendus des Séances et Mémoires
de la Société de Biologie 137,
S. 763-764, 1943
- BARR, M. and
LINWOOD, F.T. The Preservation of Aquous Prepara-
tions Containing Nonionic Surfactants.
Journal of the Am. Pharmaceutical Assoc.
46, S. 442-445, 1957
- BELOSERSKI, A.N. und
PROSKURJAKOW, N.J.
Herausg.: BORRISS, H. Praktikum der Biochemie der Pflanzen.
Berlin, S. 370-388, 1956
- BERGEY, D.H. Manual of Determinative Bacteriology.
Baltimore, 6th ed., 1948
- BLUMER, S. Untersuchungen über die Biologie von
Ustilago violacea (Pers.) Fuck.
1. Mitteilung: Ernährungs- und Kultur-
bedingungen, Wirkungen des Saponins.
Archiv f. Mikrobiol. 8, S. 458-478,
1937
- BOAS, F. Beiträge zur Kenntnis der Wirkung des
Saponins auf die pflanzliche Zelle.
Berichte d.dt.botan.Ges. 38,
S. 350-353, 1920
- BOAS, F. Untersuchungen über die Mitwirkung
der Lipide beim Stoffaustausch der
pflanzlichen Zelle.
Biochem.Zeitschr. 117, S. 166-214,
1921
- BOAS, F. Die Pflanze als kolloides System.
Naturwissenschaft und Landwirtschaft,
Heft 14, Freising-München, 1928
- BOAS, F. Dynamische Botanik.
München-Berlin, S. 146-158, 1937
- BOBB, D. and
GROMAN, N.B. The Effect of Nonionic Surface Active
Agents on Corynebacterium diphtheriae
Phage Adsorption.
Biochim.et Biophys.Acta 26, S. 648-649,
1957
- BÖMER, A.,
JUCKENACK, A. und
TILLMANS, J. Handbuch der Lebensmittelchemie.
Bd.II, Berlin, S. 864, 1935
- DAB Deutsches Arzneibuch, Ergänzungsband 6,
Berlin, S. 484, 1941

- DOSTAL, H. Die Glykosidform des Tuberkelbazillus. Frankf. Zeitschr. f. Pathologie 19, S. 198-205, 1916
- DOSTAL, H. und SAHLER, J. Über die Behandlung von chirurgischer Tuberkulose mit Tuberkelbazillenvakzine (Tebecin Dostal). Wiener Klinische Wochenschr. 31, S. 385-388, 1918
- FISCHER, W.K. Über einige Wirkungen höher konzentrierter anionischer grenzflächenaktiver Substanzen auf Bakterien. Archiv f. Mikrobiol. 31, S. 33-49, 1958
- GERUNDO, M. Effect of Saponin upon the Growth of *Mycobacterium tuberculosis*. Bacter. Proceedings, 1950, an abstract
- GLASSMAN, H.N. Surface Active Agents and their Application in Bacteriology. Bacter. Review 12, S. 105-148, 1948
- GODDARD, E.D. and SCHULMAN, J.H. Molekulare Wechselwirkung in monomolekularen Schichten. (Journal of Colloid. Sci. 8, S. 309-328, 329-340, 1953) ref.: Chem. Zentralbl., S. 5241, 1954
- GREIG, M.E. and HOOGERHEIDE, J.C. The Correlation of Bacterial Growth with Oxygen Consumption. Journ. of Bact. 41, S. 549-556, 1941
- GUIRARD, B.M., SNELL, E.E. and WILLIAMS, R.J. The Nutritial Rôle of Acetate for Lactic Acid Bacteria I. The Response to Substances Related to Acetate. Arch. of Biochem. and Biophys. 2, S. 361-379, 1946
- HAENEL, H. und SEMRAU, E. *Escherichia coli* als Vitaminbildner und Vitaminverbraucher. Ernährungsforschung 4, S. 337-340, 1959
- HAUSER, W. und LANGER, E. Über den Einfluß von Saponinen auf das Pflanzenwachstum. Phytton 2, S. 110-123, 1950
- HEINE, E.W. Saponine Pharmazie 8, S. 467-477, 1953
- HUBBARD, H. and RIMINGTON, C. The Biosynthesis of Prodigiosin, the Tripyrrylmethene Pigment from *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*). Biochem. Journ. 46, S. 220-225, 1950

- KARRER, W. Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe. Basel und Stuttgart, 1958
- KASUKÉ, I. und OTA, N. Experimental Studies on Effects of Vegetable Crude Drugs on Pathogenic Fungi (V) Effects of Saponin-containing Crude Drug (Root of *Adenophora polymorpha* Micq.) upon the Growth of Pathogenic Fungi. Bulletin of the Pharm.Res.Inst. (Osaka) 4, S. 5-11, 1953
- KLOSA, J. Über einige die Keimung von Samen und das Wachstum von Bakterien hemmende Substanzen aus Vegetabilien 3. Mitt.. Pharmazie 6, S. 63-65, 1951
- KOFLER, L. Die Oberflächenaktivität und die Giftwirkung der Saponine. Biochem.Zeitschr. 129, S. 64-72, 1922
- KOFLER, L. Chemische, physikalische und biologische Eigenschaften der Saponine. Protoplasma 7, S. 106-128, 1929
- KOFLER, L. und DAFERT, O. Über das Saponin von *Gypsophila paniculata* (Große weiße Seifenwurzel). Ber.d.dt.Pharm.Ges. 33, S. 215-229, 1923
- KRIDER, M.M., CORDON, T.C. and WALL, M.E. Steroidal Sapogenins XVI: Hydrolysis of 5 α , 22 α -spirostane glycosides by Fungal Saponases. Journ.of the Am.Chem.Soc. 76, S. 3515-3517, 1954
- KÜSTER, E. Bemerkungen zu der Abhandlung I. Lanz: "Über die Wirkung des Chrysoidins". Zeitschr.f.wiss.Mikroskopie und mikrosk. Techn. 53, S. 435-437, 1937
- LANGE, B. Kolorimetrische Analyse. Weinheim, 4. erw. Aufl., 1952
- LINSKENS, H.F. Papierchromatographie in der Botanik. Berlin-Göttingen-Heidelberg, 2. Aufl., 1959
- MAGER, J., KUCZYNSKI, M., SCHATZBERG, G. und AVI-DOR, Y. Turbidity Changes in Bacterial Suspensions in Relation to Osmotic Pressure. Journ.Gen.Microbiol. 14, S. 69-75, 1956
- MAXIM, M. Untersuchungen über die Beeinflussung der Säurefestigkeit des Tuberkelbazillus durch Saponin. Zeitschr.f.Tuberk. 72, S. 27-30, 1935

- MERCK
Chromatographie
Darmstadt, o.J.
- MONK, G.W.
Spectral Absorption of Prodigiosin
in Intact Cells.
Journ.of Bact. 74, S. 71-74, 1957
- MUNTHIU, O.B.
Saponinwirkung auf Pflanzenzellen.
Protoplasma 18, S. 441-472, 1933
- NEUBERG, C. und
SANDBERG, M.
Weitere Mitteilungen über chemisch
definierte Katalysatoren der alkoho-
lischen Gärung.
Biochem.Zeitschr. 109, S. 290-329,
1920
- PAECH, K. und
TRACEY, M.V.
Moderne Methoden der Pflanzenanalyse.
Berlin-Göttingen-Heidelberg,
Bd. I 1956,
Bd.IV 1955
- POE, C.F. and
HAWKINS, J.C.
The Effect of Some Organic Compounds
in Pigment Production by *Serratia*
marcescens.
(Univ.Colorado Stud., Ser.Chem.Pharm.
1, S. 28-37, 1952)
ref.: Botan.Abstr. 28, S. 624, Nr.6265,
1954
- POSTGATE, J.R. and
HUNTER, J.R.
Acceleration of Bacterial Death by
Growth Substrates.
Nature 198, S. 273, 1963
- PURKAYASTHA, M. and
WILLIAMS, R.P.
Association of Pigment with the Cell
Envelope of *Serratia marcescens*
(Chromob. prod.).
Nature 187, S. 349-350, 1960
- RAPOPORT, H. and
HOLDEN, K.E.
Die Synthese von Prodigiosin.
(Journ.of the Am.Chem.Soc. 84, S. 635,
1962)
ref.: Angew.Chemie 2, S. 333, 1962
- RIPPEL-BALDES, A.
Grundriß der Mikrobiologie.
Berlin-Göttingen-Heidelberg, 3.Aufl.,
1955
- RUYSEN, R. und
WYGAERTS, M.
Die Oberflächenspannung von Saponin-
lösungen.
(Mededeel.Kon.Vlaamsche Acad.Wetensch.,
Lettere, Schoone Kunsten Belgie,
Kl.Wetensch. 3, Nr.13, 1941)
ref.: Chem.Zentralbl., S. 1978-79,
1942
- SALLE, A.J.
Fundamental Principles of Bacteriology.
New York, Toronto, London, 4th ed.,
1954

- SANNIÉ, Ch. Les Saponisides (Saponines).
Exposés annuels de Biochimie médicale
9, S. 175-223, 1948
- SCHIESSER, A. Der mikrobielle Abbau von Digitonin
1. Mitt..
(Ricerca Sci. 22, S. 449-460, 1952)
ref.: Chem.Zentralbl., S. 3741-3742,
1953
- SCHOPFER, W.H. Über die Einwirkung von Aneurin auf
das Wachstum von Ustilago violacea.
Ber.d.dt.botan.Ges. 55, S. 572-576,
1937
- SCHOPFER, W.H. und
BLUMER, S. Untersuchungen über die Biologie von
Ustilago violacea (Pers.) Fuck.
2. Mitteilung: Wirkung des Aneurins
und anderer Wuchsstoffe vitaminischer
Natur.
Archiv f.Mikrobiol. 9, S. 305-367,
1938
- SCHULMAN, J.H. and
RIDEAL, E.K. Molecular Interaction in Monolayers
I. Complexes between Large Molecules
II. The Action of Hemolyse and Agglu-
tinating Agents on Lipoprotein-
Monolayers.
Proceed.of the Royal Soc. of London,
Series B, 122, S. 29-57, 1937
- SCHWARTZ, H. und
KRETZDORN, H. Untersuchungen über den Einfluß von
Saponin und anderen Giften auf die
Hefe.
Biochem.Zeitschr. 280, S. 72-87, 1935
- SOLACOLU, F. Les Saponines, Aliments hydrocarbonés
pour les Végétaux.
Comptes Rendus Hebdomad.des Séances
et Mém.de la Soc.de Biologie (65^e
année) 1, S. 304-306, 1913
- THREN, R. Saponinwirkung auf Pflanzenzellen.
Ber.d.dt.botan.Ges. 58, S. 471-482,
1940
- TORIYAMA, H. On the Abnormities of Spirogyra Cells
Caused by Saponin Solution.
Bot.Magaz.Tokyo 65, S. 68-70, 1952
- TREIBS, A. und
ZIMMER-GALLER, R. Zur Konstitution des Prodigiosins.
Hoppe-Seylers Zeitschr.f.physiol.
Chemie 318, S. 12-32, 1960
- TWORT, F.W. The Fermentation of Glucosides by
Bacteria of the Typhoid-Coli-Group
and the Acquisition of New Fermenting
Powers by Bacillus dysenteriae and
other Microorganisms. Prel. comm.
Proceed.of the Royal Soc.of London,
Series B 79, S. 329-336, 1907

- ULLMANN, E. Über die physiologische Verträglichkeit der als Lösungsvermittler und Emulgatoren verwendeten oberflächenaktiven Substanzen unter besonderer Berücksichtigung des Polyaethylenoxyderivates. Mitt.d.dt.pharm.Ges. 27, S. 1-8, 1957
- WEISS, C.M. Spectrophotometric and Chromatographic Analyses of the Pigment Produced by Members of the Genus *Serratia*. Journ.of Cellular and Comparative Physiol. 34, S. 467-492, 1949
- WILLIAMS, R.P.,
GOTT, C.L. and
GREEN, J.A. Studies on Pigmentation of *Serratia marcesc.*
V. Accumulation of Pigment Fractions with Respect to Length of Incubation Time.
Journ.of Bact. 81, S. 376-379, 1961
- WILLIAMS, R.P.,
GREEN, J.A. and
RAPOPORT, D.A. Studies on Pigmentation of *Serratia marcesc.*
I. Spectral and Paperchromatographic Properties of Prodigiosin.
Journ.of Bact. 71, S. 115-120, 1956
- WILLIAMS, R.P. and
KOSER, S.A. Bacterial Destruction of Thiamine. The Journal of Infectious Diseases 81, S. 130-134, 1947
- WINTER, A.G. und
WILLEKE, L. Die Beeinflussung der bakteriostatischen Wirkung von Senfölen durch Emulgatoren.
Zentralbl.f.Bakt. Abt.I, 170, S. 210-214, 1957
- WREDE, F. und
HETTCHE, O. Über das Prodigiosin, den roten Farbstoff des *Bacterium prodigiosum*. Ber.d.dt.chem.Ges. 62, S. 2678-2685, 1929
- WYSS, F. Variation dans la Morphologie et l'Acidorésistance du Bacille tuberculeux humain sous l'Influence d'une Saponine.
Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 177, S. 719-720, 1923

S c h l u ß w o r t

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. Franz BUKATSCH,

danke ich, daß er mir das Thema für die vorliegende
Dissertation gestellt und mit freundlichem Interesse
und fördernden Anregungen den Fortgang dieser Arbeit
verfolgt hat.

Mein Dank gilt weiterhin dem Vorstand des Botanischen
Institutes der Universität München,

Herrn Professor Dr. Leo BRAUNER,

für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.

Herrn Institutsphotographen E. KRAUSE danke ich für
die Fertigstellung der Aufnahmen.

Lebenslauf

Am 29. Mai 1932 wurde ich, Gudrun WILDNER, als Tochter des Chemikers Dipl.Ing.Dr. Hugo Wildner und seiner Ehefrau Juliane geb. Kuba in Kaaden a.d. Eger (CSR) geboren.

Im Anschluß an die Volksschule (1938 bis 1942) besuchte ich die Staatl. Oberschule für Jungen in Kaaden (1942 bis 1945), nach der Ausweisung im Juni 1945 die Oberschule in Reichenbach i.Vogtl., ab 1946 die Städt. Oberrealschule für Mädchen in Kulmbach/Ofr.. Dort legte ich 1951 die Reifeprüfung ab.

Im darauffolgenden Wintersemester begann ich das Studium der Naturwissenschaften (Biologie, Chemie, Erdkunde). Ich war drei Semester an der erweiterten Phil.-Theol.-Hochschule Bamberg, zwei Semester an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br. und vier Semester an der Ludwig-Maximilians-Universität München immatrikuliert. 1956 legte ich an der Universität München die Wissenschaftliche Prüfung für das Höhere Lehramt ab.

Bis zum Eintritt in das Pädagogische Seminar (1959) war ich am Botanischen Institut der Universität München unter der Leitung von Herrn Prof.Dr.F. Bukatsch mit den praktischen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation beschäftigt. Während dieser Zeit belegte ich als Gasthörerin an der Universität München weitere Vorlesungen und Kurse in Botanik und Hygiene.

Nach der Pädagogischen Prüfung für das Höhere Lehramt (1961) nahm ich am Deutschen Gymnasium der Franziskanerinnen in Dillingen/Donau als Assessorin meine Lehrtätigkeit auf. Seit September 1962 gehöre ich dem Lehrkörper des Staatl. Gymnasiums mit Oberrealschule am gleichen Ort an. Am 1.12.1963 wurde ich zur Studienrätin ernannt.

Neben meiner beruflichen Tätigkeit arbeitete ich an der Fertigstellung der Dissertation.

